

Aus dem Institut für Humangenetik
(Komm. Direktorin: PD Dr. med. A. Caliebe)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

***TET2*-Mutationen in Patienten mit myeloischen Neoplasien:
Eine molekulargenetische und molekularzytogenetische
Analyse**

INAUGURALDISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
DOMINIK LANGNER
aus Frankfurt am Main

Kiel 2019

Akademische Betreuerin

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 4.9.2020

PD Dr. rer. nat. Eva Maria Murga

PD Dr. rer. nat. Eva Maria Murga

Prof. Dr. med. Marc-Philip Hitz

19.11.2020

Gez.: _____

Prof. Dr. med. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Myeloische Neoplasien – Überblick	1
1.2. Klassifikation myeloischer Neoplasien	2
1.2.1. Myeloproliferative Neoplasien (MPN)	3
1.2.2. Myelodysplastische Syndrome (MDS)	4
1.2.3. Myelodysplastische / Myeloproliferative Neoplasien (MDS/MPN)	5
1.2.4. Akute myeloische Leukämie (AML) und verwandte Neoplasien	5
1.3. Das <i>TET2</i> -Gen	6
1.3.1. Die Entdeckung der „Ten-Eleven Translocation“ (TET)	6
1.3.2. Die Funktion des TET2-Proteins	7
1.3.3. Genomische-Struktur des TET2-Gens	8
1.3.4. TET2-Funktion in der Hämatopoese	8
1.3.5. TET2-Mutationen in hämatologischen Neoplasien	9
1.3.6. TET2-Mutationen und die Konzentration von 5-hydroxymethylcytosine (5hmC)	9
1.3.7. TET2-Mutationen beim gesunden Menschen	10
1.3.8. TET2-Mutationen und prognostische Relevanz bei myeloischen Neoplasien	10
1.3.9. „Loss Of Heterozygosity“ (LOH) von TET2 bei myeloischen Neoplasien	11
1.4. Fragestellung	12
2. Material	13
2.1. Reagenzien, Chemikalien und Enzyme	13
2.2. Lösungen und Puffer	14
2.3. Kits	15
2.4. Geräte	15
2.5. Untersuchtes Patientenkollektiv	16
2.6. Einschlusskriterien des Patientenkollektivs zur Untersuchung	16
2.7. Positive und Negative Kontrollen der eingesetzten Sonden	17
2.8. Literaturrecherche	17
2.8.1. Einschlusskriterien für Fälle aus der Literatur	17
2.9. Eingesetzte FISH-Sonden	18
3. Methoden	20
3.1. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	20
3.1.1. FISH	20
3.1.2. Auswertung FISH	21
3.1.3. Kontrollen und Ermittlung einer Nachweisgrenze für die FISH Analysen	24
3.2. Sanger-Sequenzierung	26
3.3. Durchführung DNA-Extraktion	27
3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	27
3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Primer	28
3.6. Agarosegel-Elektrophorese	30
3.7. Aufreinigung des PCR-Produktes	31
3.8. Durchführung Sequenzierungsreaktion und Aufreinigung	31
3.9. Kapillarelektrophorese und Auswertung	33
3.10. Next Generation Sequencing (NGS)	33

4. Ergebnisse	34
4.1. Charakteristika des ausgewählten Patientenkollektivs	34
4.2. Gruppe 1, Fälle mit einer myeloischen Neoplasie und normalem Karyotyp	34
4.3. Gruppe 2, Fälle mit einer myeloischen Neoplasie und aberrantem Karyotyp	35
4.4. Resultate des FISH-Screenings mit dem eingesetzten Sondenpanel	36
4.4.1. Ergebnisse des FISH-Screenings der Gruppe 1	37
4.4.2. Ergebnisse des FISH-Screenings der Gruppe 2	38
4.5. Mutationsstatus des <i>TET2</i> -Gens in drei Fällen mit einer <i>TET2</i> -Deletion	40
4.5.1. Sequenzvarianten im Fall 22	41
4.5.2. Sequenzvarianten im Fall 30	41
4.5.3. Sequenzvarianten im Fall 38	42
4.6. Mutationsstatus des <i>TET2</i> -Gens in vier Fällen ohne eine <i>TET2</i> -Deletion	43
4.6.1. Sequenzvarianten im Fall 26	43
4.6.2. Sequenzvarianten im Fall 27	44
4.6.3. Sequenzvarianten im Fall 28	44
4.6.4. Sequenzvarianten im Fall 29	45
4.6.5. Allelstatus des <i>TET2</i> -Lokus bei Fällen des eigenen Kollektivs (LOH von <i>TET2</i>)	46
4.7. Inzidenz von <i>TET2</i> -Deletionen und <i>TET2</i> -Mutationen im Kollektiv der Literatur	46
4.7.1. Allelstatus des <i>TET2</i> -Lokus bei Fällen der Literaturrecherche (LOH von <i>TET2</i>)	48
4.8. Korrelation der <i>TET2</i> -LOH Inzidenz zwischen den eigenen Fällen und den Literaturdaten	49
4.9. Verteilung der <i>TET2</i> -Mutationen nach Exon aller Fälle	50
4.10. Korrelation der <i>TET2</i> -Aberrationen mit den zytogenetischen Befunden	51
5. Diskussion	53
5.1. Charakterisierung des Patientenkollektivs mittels zytogenetischen und molekularzytogenetischen Techniken	53
5.2. <i>TET2</i> -Deletionen treten am häufigsten als kryptischen Veränderungen auf. Inzidenz in myeloischen Neoplasien.	54
5.3. Analyse der Inzidenz von <i>TET2</i> -Mutationen bei myeloischen Neoplasien	55
5.3.1. Inzidenz von <i>TET2</i> -Mutationen in den untersuchten Kollektiven	55
5.3.2. Art und Verteilung der <i>TET2</i> -Mutationen aller gesammelten Daten	56
5.4. Konsequenzen von <i>TET2</i> -LOH durch hemizygoten und homozygoten Mutationen	57
5.4.1. Korrelation von <i>TET2</i> -Deletionen und weiteren zytogenetischen Aberrationen zeigen keine Assoziation	58
5.4.2. Analyse der einzelnen <i>TET2</i> -Mutationen und SNPs der eigenen Kohorte	59
5.4.3. <i>TET2</i> -Mutationen ohne gleichzeitige <i>TET2</i> -Deletion (FISH)	61
6. Zusammenfassung	64
7. Ausblick	65
8. Literaturverzeichnis.....	66
9. Abkürzungsverzeichnis.....	79
9.1. Buchstabencode der Aminosäuren	81
10. Anhang	82
10.1. Tabelle der Fälle mit normalem Karyotyp mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse	82
10.2. Tabelle der Fälle mit aberrantem Karyotyp mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse	85

1. Einleitung

1.1. Myeloische Neoplasien – Überblick

Myeloische Neoplasien sind klonale Erkrankungen von Stammzellen der myeloischen Zellreihe. Die Stammzellen beeinhalteten Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile), Monozyten/Makrophagen, erythroide Vorläufer, Megakaryozyten und Mastzellen (Abbildung 1) (Vardiman et al., 2008). Diese Gruppe der Erkrankungen tritt vor allem bei älteren Individuen der fünften bis siebten Lebensdekade auf, jedoch sind sehr selten auch junge Erwachsene und Kinder betroffen. Myeloische Neoplasien sind seltene Erkrankungen, deren Inzidenz insgesamt 6-10/100 000 pro Jahr beträgt (Vardiman et al., 2008). Sie können schrittweise fortschreiten und die Hämatopoese durch Myelofibrose oder Verdrängung der gesunden Stammzellen beeinträchtigen sowie durch Transformation in einer Blastenkrise münden (Vardiman et al., 2008).

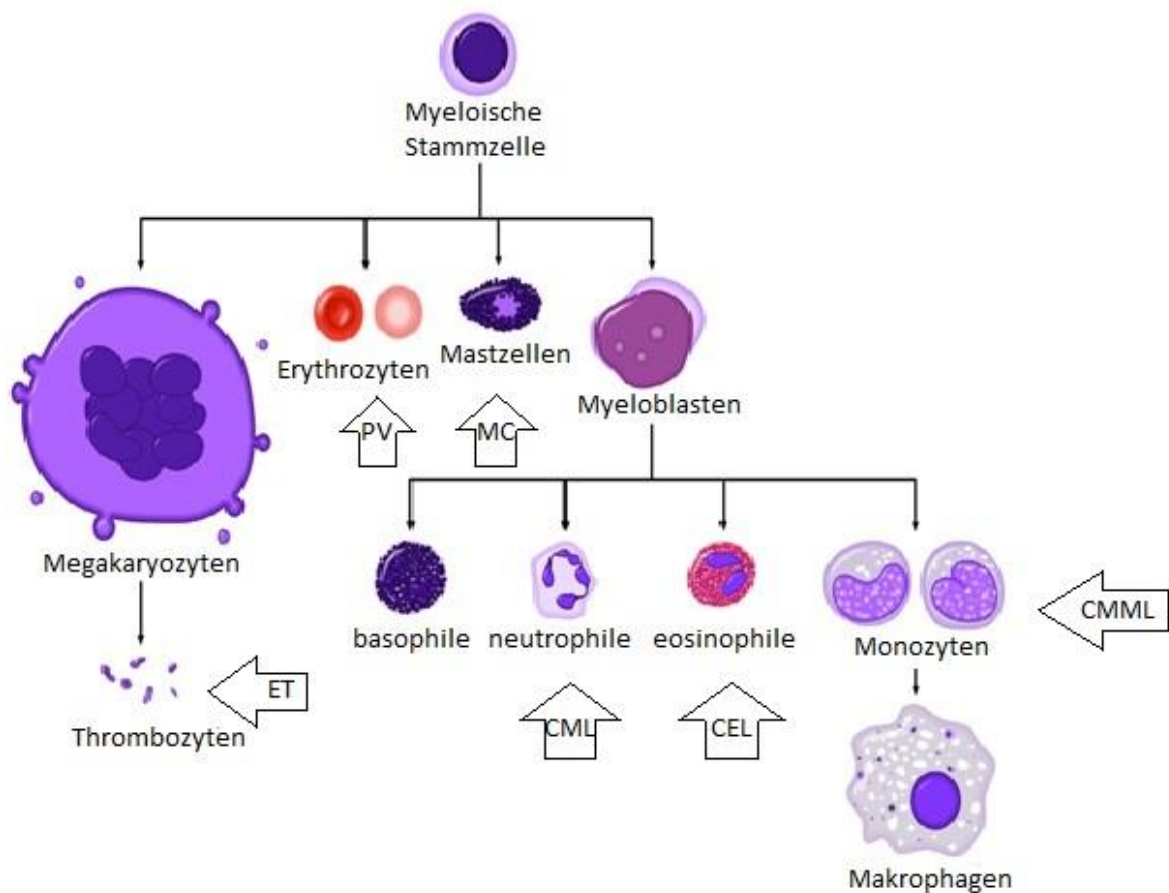


Abbildung 1. Schema der myeloischen Zellreihe mit entsprechenden Erkrankungen. ET: Essentielle Thrombozytopenie, PV: Polycythämia vera, MC: Systemische Mastozytose, CML: Chronische myeloische Leukämie, CEL: Chronische Eosinophile Leukämie, CMML: Chronische myelomonozytäre Leukämie. (Modifiziert nach Swerdlow et al., 2008)

1.2. Klassifikation myeloischer Neoplasien

Die Klassifikation der myeloischen Neoplasien erfolgt nach der „World Health Organization“ (WHO)-Klassifikation lymphatischer und hämatopoetischer Neoplasien, die 2001 publiziert und 2008 sowie 2016 aktualisiert wurde (Swerdlow et al., 2008; Arber et al., 2016).

Es erfolgt eine kursorische Übersicht über die geläufigsten myeloischen Neoplasien, einschließlich der für die vorliegende Arbeit relevanten myeloischen Neoplasien.

Tabelle 1. Einteilung der myeloischen Neoplasien. Einteilung der myeloischen Neoplasien nach WHO-Klassifikation 2016, um einige Punkte gekürzt. (modifiziert nach Arber et al, 2016)

Myeloproliferative Neoplasien (MPN)
Chronische myeloische Leukämie (CML), <i>BCR-ABL1</i> +
Chronische Neutrophilen-Leukämie (CNL)
Polyzythämia vera (PV)
Primäre Myelofibrose (PMF)
Essentielle Thrombozythämie (ET)
Chronische Eosinophilen-Leukämie, nicht anderweitig Klassifiziert (NOS)
MPN, nicht klassifizierbar
Mastozytose
Kutane Mastozytose (CM)
Systemische Mastozytose
Mastzell Sarkom
Myeloische/lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie und Rearrangierung von <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i> oder <i>FGFR1</i>, oder mit <i>PCM1-JAK2</i>
Myeloische/lymphatische Neoplasie mit Rearrangierung von <i>PDGFRA</i>
Myeloische/lymphatische Neoplasie mit Rearrangierung von <i>PDGFRB</i>
Myeloische/lymphatische Neoplasie mit Rearrangierung von <i>FGFR1</i>
Provisorische Entität: Myeloische/lymphatische Neoplasie mit <i>PCM1-JAK2</i>
Myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasien (MDS/MPN)
Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML)
Atypische chronische myeloische Leukämie (aCML), <i>BCR-ABL1</i> -
Juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML)
MDS/MPN mit Ringsideroblasten und Thrombozytose (MDS/MPN-RS-T)
MDS/MPN, nicht klassifizierbar
Myelodysplastische Syndrome (MDS)
MDS mit unilineärer Dysplasie (MDS-SLD)
MDS mit Ringsideroblasten (MDS-RS)
MDS mit multilineärer Dysplasie (MDS-MLD)
MDS mit Blastenexzess (MDS-BE)
MDS mit isoliertem del(5q)
MDS, nicht klassifizierbar (MDS-U)
Provisorische Entität: refraktäre Zytopenie der Kindheit

Akute myeloische Leukämie (AML) und verwandte Neoplasien
AML mit rekurrenter genetischer Anomalie
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasie
AML, nicht anderweitig klassifiziert (NOS)
Myeloisches Sarkom
Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Proliferation
Akute Leukämien unklarer Linienzugehörigkeit
Akute undifferenzierte Leukämie
Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (MPAL) mit t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> +
MPAL mit t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearrangiert
MPAL, B/myeloisch, nicht weiter klassifiziert (NOS)
MPAL, T/myeloisch, nicht weiter klassifiziert (NOS)

1.2.1. **Myeloproliferative Neoplasien (MPN)**

Die myeloproliferativen Neoplasien (MPN) bilden eine Gruppe von Erkrankungen, die in sieben Entitäten unterteilt ist (siehe Tabelle 1).

Die häufigste aller MPN ist die chronische myeloische Leukämie, *BCR-ABL*⁺ (CML). Gut 15% aller Leukämien des Erwachsenen fallen in diese Entität. Bei dieser Erkrankung handelt sich um eine Neoplasie der neutrophilen Granulozyten und ihrer Vorläuferzellen. Pathophysiologisch liegt eine balancierte Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 vor. Die Translokation t(9;22)(q34;q11) resultiert in einer Fusion des *ABL*-Gen auf Chromosom 9 und des *BCR*-Gen auf Chromosom 22, die für das bekannte Fusionsonkogen *BCR-ABL* kodiert. Das Aufkommen der Tyrosinkinaseinhibitoren hat dafür gesorgt, dass diese vormals letal verlaufende Erkrankung nun eher eine chronische geworden ist (Granatowicz et al., 2015).

Ebenfalls zur Gruppe der MPN gehören die Polycythemia vera (PV) und die essentielle Thrombozytopenie (ET). Es handelt sich hier um Neoplasien der Erythrozyten und Thrombozyten mit Vermehrung der jeweiligen Zellreihe und ihrer Vorläuferzellen. Beides sind chronische Erkrankungen mit langjährigen Verläufen. In 10% (PV) bzw. 5% (ET) der Fälle kommt es nach 20 Jahren zu einer leukämischen Transformation, mit einem etwas höheren Prozentsatz zu einer Myelofibrose.

Die PV wird über eine *JAK2*-Mutation definiert. *JAK2* ist eine Kinase, welche durch eine Punktmutation an der Nukleotidposition 2343 des Exons 14 des *JAK2*-Gens mit Austausch von Guanin durch Thymin aktiviert wird und zu einer vermehrten Teilungsaktivität der betroffenen Zellen führt (Tefferi et al., 2017). Diese Mutation kommt in 95% der PV vor (Pardanani et al., 2007). In den restlichen 5% der Fälle sind Mutationen im Exon 12 des *JAK2*-Gens nachweisbar (Vannucchi et al., 2008).

Bei der ET sind zusätzlich zu *JAK2*-Mutationen auch Mutationen in den *CALR* und *MPL*-Genen als ursächliche Mutationen beschrieben (jeweils in 55, 25 und 5% der Fälle). Allerdings sind ca. 17 % der betroffenen Patienten „triple-negativ“ für *JAK2*, *CALR* und *MPL*-Mutationen.

Sowohl bei der PV als auch bei der ET wurden in über 50% der Fälle weitere Mutationen gesehen, hauptsächlich in den Genen *TET2* und *ASXL1*. Ein Zusammenhang mit dem Mutationsstatus von *JAK2*, *CALR* und *MPL* wurde nicht beschrieben. Eine prognostische Bedeutung von *TET2* und *ASXL1* Mutationen bei der PV und ET konnte nicht festgestellt werden (Tefferi et al., 2017).

1.2.2. Myelodysplastische Syndrome (MDS)

Bei den myelodysplastischen Syndromen (MDS) handelt es sich um Erkrankungen, welche durch ineffektive Hämatopoese mit Zytopenien im peripheren Blut auffallen. Diese werden hervorgerufen durch morphologische Dysplasien der hämatopoetischen Stammzellen (Germing et al., 2001). Die zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchungen haben in den letzten Jahren bedeutend zur besseren Klassifizierung und Diagnoseerstellung der unterschiedlichen MDS Subentitäten beigetragen. Man unterscheidet zwischen einem MDS mit einem oder mit mehreren dysplastischen Klonen, mit Ringsideroblasten, mit Blastenüberschuss sowie das MDS mit isolierter del(5q) (Tabelle 1).

Zytogenetische Aberrationen sind häufig, die Deletion des langen Armes eines Chromosoms 5 (del(5q)) ist jedoch die einzige Krankheitsdefinierende, die übrigen wie zum Beispiel Trisomie 8, Verlust des Y-Chromosoms (-Y), Monosomie 7, Deletionen des langen Arms eines Chromosoms 7 (del(7q) bzw. 7q-) und die Deletion des langen Armes eines Chromosoms 20 (del(20q)) sind wichtig zur Prognosebestimmung bzw. Risikostratifizierung der Patienten. Hierzu werden die Patienten anhand des überarbeiteten IPSS-R-Schemas in 5 prognostische Gruppen eingeteilt (Greenberg et al., 2012). Die Gruppeneinteilung geht von sehr guter Prognose („*very low risk*“) bis zu sehr schlechter Prognose („*very high risk*“), zur Einteilung wird ein Punktesystem genutzt. Hierzu werden für den Hb-Wert, die Anzahl der Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten sowie dem Prozentsatz der Blasten im peripheren Blut eine unterschiedliche Anzahl von Punkten vergeben. Der Karyotyp wird ebenfalls mitberücksichtigt. Dieser wird in A-E unterteilt, von sehr gut bis sehr schlecht und es werden ebenfalls Punkte vergeben (Greenberg et al., 2012).

In 80-90% der MDS-Fälle wurden zusätzliche Mutationen gefunden, die häufigsten betreffen die Gene *SF3B1*, *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *U2AF1*, *TP53* und *EZH2*. Auch diese werden spezifisch zur Prognosebestimmung herangezogen. *TP53*-Mutationen zum Beispiel sind generell mit einem aggressiven Verlauf assoziiert (Haferlach et al., 2014).

Unter allen Mutationen stellen die *TET2*-Mutationen mit bis zu 33% einen sehr großen Anteil dar (Haferlach et al., 2013). Der prognostische Einfluss von *TET2*-Mutationen ist kontrovers diskutiert und bislang nicht eindeutig geklärt.

1.2.3. Myelodysplastische / Myeloproliferative Neoplasien (MDS/MPN)

Diese Gruppe umfasst alle myeloischen Erkrankungen welche sowohl Charakteristika der myeloproliferativen als auch einer myelodysplastischen Neoplasie aufweisen. Dazu gehören die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML), die atypische CML, *BCR-ABL*-, die juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) und MDS/MPN mit Ringsideroblasten und Thrombozytose (Tabelle 1) (Arber et al., 2016).

Die CMML ist eine klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen mit Merkmalen eines MDS und einer MPN. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine klonale Vermehrung der Monozyten, nach 3-5 Jahren kommt es in 15-20% der Fälle zu einer leukämischen Transformation. In 30% der Fälle kommen hier zytogenetische Aberrationen vor, vor allem Trisomie 8, -Y, Monosomie 7, del(7q) bzw. 7q- und Trisomie 21 (Patnaik et al., 2013; Onida et al., 2002).

Nach der Einführung der Hochdurchsatz-Sequenzierung, auch bekannt als „*Next-Generation Sequencing*“ (NGS), stellte man fest, dass Genmutationen in über 90% der CMML-Patienten nachweisbar sind (Patnaik et al., 2013). Am häufigsten wurden Mutationen in den Genen *TET2* (60%), *SRFS2* (50%), *ASXL1* (40%) und *RAS* (30%) identifiziert (Patnaik et al., 2018).

CMML-Patienten werden anhand des Mayo Molecular Model in 4 Risikogruppen eingeteilt, dies erfolgt anhand von Thromozytenzahl, Hämoglobinwert, Nachweis von unreifen myeloischen Zellen im peripheren Blut und Vorhandensein einer *ASXL1*-Mutation (Patnaik et al., 2013). Eine der neueren Studien ergab einen positiven prognostischen Zusammenhang von *TET2*-Mutationen bei CMML-Patienten, wenn gleichzeitig keine *ASXL1*-Mutation vorliegt. *ASXL1*-Mutationen alleine waren mit einem schlechteren Gesamtüberleben vergesellschaftet (Patnaik et al., 2017). In einer Metaanalyse jedoch ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und vorhandenen *TET2*-Mutationen (Lin et al., 2017). Jüngere CMML-Patienten (< 65 Jahren) mit *TET2*-Mutationen sprachen signifikant häufiger auf die Behandlung mit Hypomethylierungsagenten an (Patnaik et al., 2015).

1.2.4. Akute myeloische Leukämie (AML) und verwandte Neoplasien

Es handelt sich hier um akute Leukämien der myeloischen Zellreihe, welche durch verschiedenste Pathomechanismen neu entstehen oder aus anderen Erkrankungen heraus transformieren können. Sie ist definiert durch eine Blastenanzahl von über 20% im Knochenmark und führt letztlich über dessen Versagen zum Tode. Auch können die Blasten ins periphere Blut ausgeschwemmt werden und andere Organe infiltrieren. Man unterscheidet zwischen einer AML mit rekurrenten genetischen Aberrationen, einer AML mit

myelodysplastischen Veränderungen, therapieassoziierten myeloischen Neoplasien und einer Gruppe von nicht anderweitig klassifizierbaren Entitäten. Die Zusammenschau aus klinischen, pathologischen, zyto- und molekulargenetischen Daten soll letztlich eine prognostische Einteilung zur Wahl der richtigen Therapie ermöglichen (Arber et al., 2016).

Zuletzt wurden bei AML-Patienten durch NGS große Fortschritte bei der Identifizierung von vorliegenden Mutationen gemacht. Am häufigsten wurden Veränderungen in *ASXL1* (20.7%), *TET2* (15.3%), *RUNX1* (15.2%), *DNMT3A* (14.8%), *TP53* (14.4%), *IDH2* (12%), *NRAS* (11.9%), *FLT3* (11%), and *NPM1* (11%) identifiziert (Hussaini et al., 2018). Eine Metaanalyse von 2014 mit insgesamt 8 Arbeiten und Daten von 2550 Patienten mit einer AML konnte die Assoziation zwischen *TET2*-Mutationen und einem ungünstigen Erkrankungsverlauf bestätigen (Liu et al., 2014).

1.3. Das *TET2*-Gen

Wie aus dem vorherigen Kapitel (Kapitel 1.2) ersichtlich ist, trägt die Detektion und Identifikation genetischer Mutationen erheblich zur Diagnoseerstellung und Risikostratifizierung der Patienten mit myeloischen Neoplasien bei. Viele myeloische Erkrankungen werden von der Präsenz einer bestimmten Mutation definiert, wie die Translokation t(9;22) bei CML, *BCR-ABL+* (Vardiman et al., 2002). Anderen Mutationen wird eine prognostische Bedeutung zugeschrieben, wie zum Beispiel *TP53*. Eine Mutation in *TP53* ist bei myeloischen Neoplasien zumeist mit einem geringeren Gesamtüberleben vergesellschaftet. (Peller et al., 2003).

Mutationen im *TET2*-Gen treten als rekurrente genetische Läsion bei verschiedenen myeloischen Neoplasien auf. Die Inzidenz ist hoch, es gibt eine erhebliche Menge an Daten bezüglich myeloischen Neoplasien und *TET2*-Mutationen und es kommt bei diversen Entitäten mit hoher Inzidenz vor (Kapitel 1.2.1-4). Die Bedeutung von *TET2*-Mutationen in myeloischen Dysplasien bleibt jedoch umstritten.

Im Folgenden werden ein Überblick über die physiologische Funktion des *TET2*-Gens im hämatopoetischen System sowie den Effekt von *TET2*-Mutation gegeben.

1.3.1. Die Entdeckung der „Ten-Eleven Translocation“ (*TET*)

Zwei Arbeitsgruppen hatten im Jahr 2002 unabhängig voneinander das Gen *TET1* als Fusionspartner des *MLL*-Gens bei Patienten mit AML mit der Translokation t(10;11)(q22;q23) identifiziert (Ono et al., 2002; Lorsch et al., 2003). Bei einem 67-jährigen Patienten mit AML M2 mit trilinearer Dysplasie wurde *TET1* zunächst unter dem Namen *LCX* (*leukaemia-associated protein with a CXXC domain*) identifiziert (Ono et al., 2002). Das Protein besitzt eine Zink-bindende CXXC-Domäne, es wurde bereits über dessen mögliche Rolle bei der Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter DNA spekuliert (Ono et al., 2002).

Bei einem 8-jährigen Jungen mit AML wurde ebenfalls dieses Gen gefunden, es wurde nach der Translokation von Chromosom 10 zu Chromosom 11 *TET1* genannt (Lorsbach et al., 2003). *TET1* ist lokalisiert auf 10q22, mittels Datenbankanalyse wurden *TET2* auf 4q24 und *TET3* auf 2p12 als weitere Mitglieder dieser neuen Proteinfamilie identifiziert. *TET3* zeigte die weitreichendste Expression in den verschiedenen Geweben und Organen, nur *TET2* ist im Knochenmark vertreten (Lorsbach et al., 2003). Ein möglicher Zusammenhang mit Erkrankungen des Knochenmarkes lag nahe.

1.3.2. Die Funktion des *TET2*-Proteins

Im Jahr 2009 wurde in Zellkulturen und in vitro gezeigt, dass die „*ten-eleven translocation 1*“ (*TET1*) eine Rolle in der epigenetischen Regulation spielt (Tahiliani et al., 2009). *TET2* kodiert eine Dioxygenase welche 5-Methylcytosine (5-mC) zu 5-Hydroxymethylcytosine (5-hmC) umbaut, indem sie ein Sauerstoffatom an die Methylgruppe von 5-mC transferiert. Sobald eine TET-Dioxygenase die 5-mC zu 5-hmC Umwandlung katalysiert, folgen mehrere biochemische Reaktionen (Abbildung 2). Letztlich wird die Position durch ein unmodifiziertes Cytosin ersetzt (Tahiliani et al., 2009). Diese Aktivität konnte für die ganze *TET*-Familie nachgewiesen werden (Ito et al., 2010).

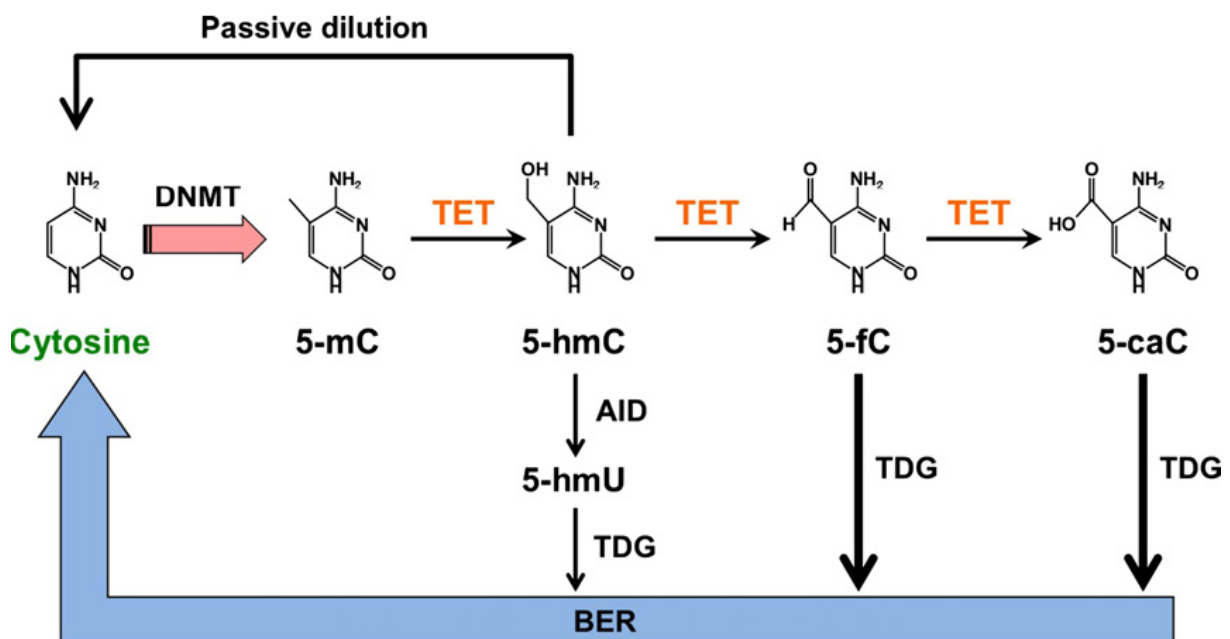


Abbildung 2. Pathway der Demethylierung von Cytosin durch die *ten-eleven translocation* (TET) Proteine. AID: Adenosindeaminase; BER: Basenexzisionsreparatur; 5-caC: 5-Carboxylcytosin; DNMT: DNA Methyltransferase; 5-fC: 5-Formylcytosin; 5-hmC: 5-Hydroxymethylcytosin; 5-hmU: 5-Hydroxymethyluracil; 5-mC: 5-Methylcytosin; TDG: Thymin-DNA-Glykosylase. (Modifiziert nach Nakajima et al., 2014).

Letztlich konnte 2011 in Zellkulturmodellen sowie in vitro demonstriert werden, dass die Proteine der TET-Familie die weitere Oxidierung von 5hmC zu 5-Formylcytosin und 5-Carboxylcytosin katalysieren können (Pfaffeneder et al., 2011; Ito et al., 2011; He et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass die Reaktionsprodukte der Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) mittels Basenexzisionsreparatur aus der DNA entfernt werden können (He et al., 2011). Ein

Modell für die Demethylierung von DNA wurde erfolgreich etabliert (Abbildung 2). Die Methylierung von Cytosin in DNA ist eine evolutionär hoch konservierte Möglichkeit zur epigenetischen Regulierung in Eukaryoten. Diese Methylierung führt zur Unterdrückung (*Silencing*) der Expression des betroffenen Genes. (Nabel et al., 2011).

Der Genort von *TET2* (4q24) war bei Patienten mit myeloischen Neoplasien häufig von Mikrodeletionen und „loss of heterozygosity“ (LOH) betroffen. Es fanden sich in Knochenmarksproben von Erkrankten eine niedrigere Aktivität von 5-Hydroxymethylcytosine (5hmc) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Ko et al., 2010).

Beim MDS, dem MPN und der AML wurden Mutationen in *IDH1*, *IDH2* und *TET2* gefunden, welche die Modifikation der DNA mit 5-hmc und damit die Methylierung der DNA und ihre Aktivität beeinflussen (Shih et al., 2012).

1.3.3. Genomische-Struktur des *TET2*-Gens

Das Gen *TET2* besteht aus 11 Exons, es gibt 9 verschiedene Splicevarianten. Größtenteils beziehen sich die publizierten Daten auf die *TET2* mRNA variant 1 (10166 bp) und das resultierende Protein TET2 isoform a (2002 aa), kodierend sind Exon 3-11 (Ensembl, 2018, Accession Number HGNC: 25941). Die Sequenz enthält 2 evolutionär konservierte Regionen: Eine von Aminosäure 1134 bis 1444 sowie eine zweite Region in der Nähe des c-terminalen Endes von Aminosäure 1842 bis 1921. Kleinste Veränderungen dort bewirken bereits mit höchster Wahrscheinlichkeit ein unbrauchbares Proteinprodukt (Tahiliani et al., 2009).

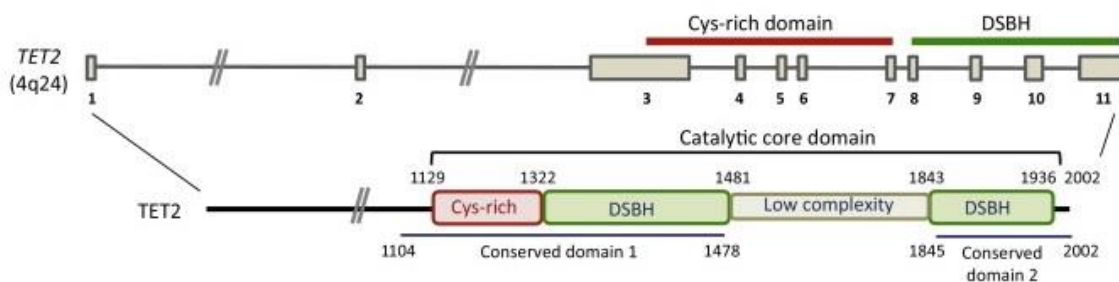


Abbildung 3. Struktur des *TET2*-Gens mit seinen 11 Exons und den beiden konservierten Regionen. DSBH: double stranded beta helix. (Modifiziert nach Huang et al., 2014)

1.3.4. *TET2*-Funktion in der Hämatopoese

Die Funktion des *TET2*-Gens in der physiologischen Hämatopoese und bei myeloischen Neoplasien wurde mittels *in vivo*- und *in vitro*-Studien ermittelt. Es besteht eine hohe Expression in hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und Vorläuferzellen und wird während der Differenzierung herunterreguliert (Ko et al., 2010). Experimente mit Knockout-Mäusen und RNAi-Inhibierung bei menschlichem Nabelschnurblut ergab eine verringerte Konzentration von 5hmC und begünstigte eine Expansion der monozytären Zellreihe. Alle *TET2*^{-/-} Mäuse zeigten einen ähnlichen Phänotyp, es fielen eine Vermehrung der

hämatopoetischen Stammzellen sowie eine fehlerhafte Differenzierung der myelomonozytären Reihe auf. Veränderungen in der B- und T-Zell-Entwicklung wurden ebenfalls beschrieben. Insgesamt haben die HSC der *TET2*^{-/-} Mäuse einen Überlebensvorteil über die Wildtyp-HSCs, es traten CMML- und MPN-ähnliche Erkrankungen bei den Mäusen auf. Die Latenz bis zum Beginn der Erkrankungen lässt weitere notwendige Mutationen vermuten. Es zeigten sich die myeloproliferativen Effekte und Defekte in HSCs sowohl bei *TET2*^{-/-} und *TET2*^{+/-}-Knockout-Mäusen. Jedoch traten die Erkrankungen bei den *TET2*^{-/-}-Mäusen früher und häufiger auf, außerdem waren die Auswirkungen auf die Myelopoese eher milder bei den *TET2*^{+/-}-Mäusen. Daher wird von einer dosisabhängigen Tumorsuppressorfunktion ausgegangen, das Ausschalten eines Allels reicht für Effekte aus, ein vollständiger Verlust der *TET2*-Funktion verstärkt diese (Ko et al., 2011; Moran-Crusio et al., 2011; Li et al., 2011; Quivoron et al., 2011).

1.3.5. *TET2*-Mutationen in hämatologischen Neoplasien

TET2-Mutationen wurden in diversen hämatologischen Neoplasien gefunden. Die höchste Rate an Mutationen findet sich bei der CMML, gleichzeitig ist diese dort auch die häufigste Mutation (Patnaik et al., 2018). Beim MDS ist *TET2* ebenfalls am häufigsten mutiert (Haferlach et al., 2014). Vor allem bei der sekundären AML finden sich Veränderungen im *TET2*-Gen, aber auch bei de-novo-Fällen (Fernandez-Mercado et al., 2012). Insgesamt scheinen *TET2*-Mutationen ein frühes Event in der Pathogenese myeloischer Dysplasien zu sein, benötigt für die Entwicklung dieser noch weitere Veränderungen (Delhommeau et al., 2009; Tefferi et al., 2009b). Zu dieser Annahme gelangte man ebenfalls im Rahmen der Funktionsuntersuchungen für das *TET2*-Gen, es wurde von einer dosisabhängigen Tumorsuppressorfunktion ausgegangen (Kapitel 1.3.4).

1.3.6. *TET2*-Mutationen und die Konzentration von 5-hydroxymethylcytosine (5hmC)

Bis heute haben sich widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf *TET2* und myeloischen Neoplasien ergeben, seine Rolle sowie Prognose betreffend. Weitere bislang unbekannte Pathways oder Einflussfaktoren wurden gesucht. Im Gegensatz zu den bisherigen Erkenntnissen zeigte sich 2016 bei Individuen mit MDS oder AML, dass der Mutationsstatus des *TET2*-Gens wider Erwarten nicht immer mit der Genexpression der *TET2*-mRNA korrelierte. Es scheint weitere Mechanismen zu geben, welche die Genexpression bei diesen Erkrankungen reduzieren (Scopim-Ribeiro et al., 2016).

Eine Arbeitsgruppe um Buscarlet et al. untersuchte diesen Zusammenhang ebenfalls. Es wurden mittels einer speziellen Massenspektrometrie („*liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring*“) die Level von 5hmC und 5mC in der Zelle gemessen und mit dem Mutationsstatus von *TET2* und den weiteren

Genen der epigenetischen Regulation korreliert (*DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* und *WT1*). Sowohl höheres Lebensalter als unabhängiger Faktor als auch Mutationen von *TET2* und *DNMT3A* sorgten für ein niedriges Level von 5hmC. Somit scheinen niedrige Level von 5hmC einer multifaktoriellen Genese zu unterliegen (Buscarlet et al., 2016).

1.3.7. *TET2*-Mutationen beim gesunden Menschen

Es war schon zuvor aufgefallen, dass bei gesunden Individuen Treiber-Mutationen von hämatologischen Neoplasien gefunden wurden, ohne dass eine dieser Erkrankungen vorlag (Genovese et al., 2014). Am häufigsten betroffen sind die Gene *DNMT3A* und *TET2*. Insbesondere bei *TET2*-Veränderungen wurde eine Häufung mit zunehmendem Alter beobachtet (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014). Diese Begebenheit wurde in 2 großen Kohortenstudien untersucht (Buscarlet et al., 2017; Zink et al., 2017). Es fanden sich Populationen von Klonen hämatopoetischer Stammzellen sowohl mit als auch ohne Treiber-Mutationen ohne Hinweise auf eine hämatologische Erkrankung. Zu den identifizierten mutierten Genen zählten *TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1* und *PPM1D*. Das häufige Vorkommen von *DNMT3A*- und *TET2*-Mutationen sowie die vermutete Altersabhängigkeit korrelierten. Außerdem konnte durch Vergleiche zwischen Zwillingen eine familiäre Prädisposition von *TET2*-Mutationen gesichert werden (Buscarlet et al., 2017). Ein Auftreten dieser klonalen Veränderungen mit und ohne bislang bekannte Treiber-Mutationen zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit einer erhöhten Mortalität und einem erhöhten Risiko für einen Progress zu einer hämatologischen Neoplasie. Es wurde der Begriff "CHIP" (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*) eingeführt um diese Veränderungen zu beschreiben (Buscarlet et al., 2017; Zink et al., 2017).

1.3.8. *TET2*-Mutationen und prognostische Relevanz bei myeloischen Neoplasien

Wie es im Kapitel 1.3.6 erwähnt wurde, sind die Aussagen hinsichtlich der klinischen Relevanz von *TET2*-Mutationen widersprüchlich. Es scheint eher eine positive prognostische Relevanz bei MDS-Patienten und eine eher negative bei AML-Patienten vorzuliegen. Bei der AML wurden in Kohorten mit mehreren hundert Patienten teils ein geringeres Gesamtüberleben (Abdel-Wahab O et al., 2009; Metzeler et al., 2011) und teils kein Effekt auf die Prognose gesehen (Kosmider et al., 2011; Nibourel et al., 2010). Bei MDS-Patienten gab es sowohl Hinweise auf einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben (Kosmider et al., 2009), eine weitere Studie sah keine Signifikanz (Bejar et al., 2011). Bei MPN-Patienten wurde kein Effekt auf das Gesamtüberleben gefunden (Tefferi et al., 2009). Ebenso wurde bei CMML-Patienten mit *TET2*-Mutationen keine prognostische Relevanz in Hinblick auf das Gesamtüberleben gefunden (Lin et al., 2017; Smith et al., 2010).

Auch die Reihenfolge des Auftretens bestimmter Mutationen bei myeloischen Neoplasien spielt eine Rolle. In der Auswertung klinischer Parameter bei PV-Patienten wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten gesehen, je nach der Reihenfolge in der eine *TET2*- und *JAK2*-Mutation erworben wurde. Dies betraf auch das Ansprechen auf bestimmte Therapien und könnte erklären, warum es auch anderen Entitäten betreffend widersprüchliche Aussagen zur Prognose bei *TET2*-Mutationen gibt. (Ortmann et al., 2015).

1.3.9. „Loss Of Heterozygosity“ (LOH) von *TET2* bei myeloischen Neoplasien

Am Anfang dieses Abschnittes (Kapitel 1.3.2) ist von LOH die Rede. Ebenso ist beschrieben, dass der Genort von *TET2* bei Patienten mit myeloischen Neoplasien häufig davon betroffen ist. Es wird nun im Folgenden näher darauf eingegangen.

Fast jede diploide somatische Zelle beim Menschen besitzt mit Ausnahme der Geschlechtschromosomen je zwei Kopien des Genoms, ein Allel je von einem Elternteil. In bestimmten Regionen unterscheiden sich die Erbinformationen aufgrund der sogenannten „single nucleotide polymorphisms“ (SNP) und diese Regionen können heterozygot sein. Ein SNP beschreibt die genetische Variation beim Menschen, jede repräsentiert einen einzigen Unterschied auf Nukleotidebene. Die meisten SNP haben keinen Effekt und kommen in den Bereichen zwischen Genen vor. Weist nun eine Zelle nur ein funktionierendes Allel auf und es kommt zum Verlust des anderen Allels durch Mutation oder Deletion eines kleineren oder größeren Chromosomenabschnittes an einem dieser Orte spricht man von einem „Loss Of Heterozygosity“. Davon unterscheidet sich die „copy-neutral LOH“ (CN-LOH), hier kommt nach Verlust eines paternalen oder maternalen Allels während der Mitose durch Reparaturmechanismen zu einer Duplikation des verbliebenen Allels (erworbene uniparentale Disomie) (O’Keefe C et al., 2010). Durch Duplikation einer Mutation oder epigenetisch modifizierten Regionen kann sich eine Zelle so einen Selektionsvorteil verschaffen. Es wurde bei myeloischen Neoplasien durch erworbene uniparentale Disomie entstandene CN-LOH festgestellt, auch das *TET2*-Gen betreffend (Jankowska et al., 2009).

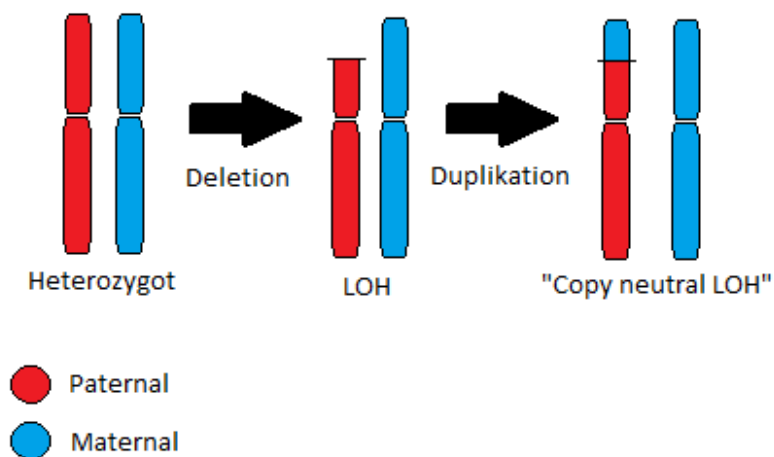


Abbildung 4. Schematische Darstellung von „loss of heterozygosity“ (LOH) auf Chromosomenebene.

In groß angelegten Studien mit Karyotypisierungen und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) unter anderem vom *TET2*-Genort wurde nur selten eine Deletion des *TET2*-Genortes gesehen, insbesondere bei myeloischen Neoplasien. War jedoch ein Allel des *TET2*-Gens deletiert, traten in hoher Frequenz hemizygote Mutationen auf dem anderen Allel auf (La Starza et al., 2012). Diesem Umstand ging eine weitere Arbeitsgruppe nach (Bacher et al., 2011). In ca. 5-6% der Fälle wurden mittels FISH-Analyse *TET2*-Deletionen in ähnlicher Verteilung bei Patienten mit MDS, AML, MPN und CMML gesehen. In 50% der Fälle waren diese kryptisch, in der Chromosomen-Bänderungsanalyse also nicht zu erkennen. Ebenfalls in 50% der Fälle traten auf dem verbleibenden Allel eine oder sogar mehrere hemizygote Mutationen auf (*TET2*-LOH). Dabei handelte es sich vermehrt um *Frameshift* oder Nonsensemutationen, es traten häufiger mehrere Mutationen auf dem verbleibenden Allel auf. Eine prognostische Relevanz wurde hier zwar vermutet, jedoch bestätigte sich dies in weiteren Studien nicht (Bacher et al., 2011). Sowohl die *TET2*-Deletionen als auch die Häufung der Mutationen auf dem anderen Allel wurden nicht mehr relevant aufgegriffen.

1.4. Fragestellung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, ein Kollektiv von Patienten mit einer myeloischen Neoplasie in Hinblick auf *TET2*-Mutationen mittels molekularzytogenetischer und molekulargenetischer Methoden zu analysieren. Aufgrund der Seltenheit von molekularzytogenetischen Daten über den numerischen *TET2*-Status wurde das Patientenkollektiv mit Daten aus einer umfangreichen Literaturrecherche erweitert. Für diese Arbeit war daher geplant:

1. Ein Kollektiv von Patienten mit einer myeloischen Neoplasie aus dem Archiv des Instituts für Humangenetik, UKSH Kiel, zu erstellen. Eine Chromosomen-Bänderungsanalyse der Routinediagnostik sollte in den Fällen zur Verfügung stehen.
2. Die Fälle mittels der FISH-Technik in Hinblick auf die für die myeloischen Neoplasien charakteristischen numerischen und strukturellen Veränderungen zu untersuchen, ergänzend mit einer spezifischen Sonde zum Nachweis von Deletionen des *TET2*-Gens.
3. Die Fälle mit aberranten *TET2*-Befunden nach FISH mittels DNA-Sequenzierungsverfahren nach *TET2*-Mutationen weiter zu evaluieren.
4. Den Stellenwert des *TET2*-Mutationsspektrums in Zusammenhang mit weiteren zytogenetischen Aberrationen zu bringen.
5. Insbesondere sollte neue Erkenntnisse hinsichtlich *TET2*-LOH durch Deletion oder biallelische Mutationen gewonnen werden.

2. Material

Der folgende Abschnitt enthält die bei den Versuchen verwendeten Materialien sowie einen Überblick über die ausgewerteten Fälle. Allgemein gebräuchliche Laborgerätschaften wie Glaswaren und Pipetten werden nicht gesondert aufgeführt.

2.1. Reagenzien, Chemikalien und Enzyme

Agarose (Eurogentec, Seraing, Belgien)

AmplitaqGold Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.)

Borsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Cell-Lysis Solution (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

DABCO (Sigma-Aldrich)

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-2HCL) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Desoxynucleosid-Triphosphat Set (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Dimethylsulfoxid (Merck)

EDTA 10x Puffer (Applied Biosystems)

Ethanol (Merck)

Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich)

Fixogum-Kleber (Marabu, Tamm, Deutschland)

3130 Genetic Analyzer Performance Optimized Polymer 7 (Applied Biosystems)

3130 Genetic Analyzer Capillaries (Applied Biosystems)

Glycerol (Merck)

Glycerol Reagent Plus (Sigma-Aldrich)

HCl (Merck)

HiDi Formamide (Applied Biosystems)

Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich)

Isopropanol (Merck)

LiChrosolv H₂O (Merck)

MgCl₂ (Applied Biosystems)

NaCl (Sigma-Aldrich)

Na₃Citrat (Merck)

NaOH (Merck)

Paraformaldehyd (Serva, Heidelberg, Deutschland)

PCR-Puffer II (Applied Biosystems)
Pepsin (Sigma-Aldrich)
Protein Precipitation Solution (Sigma-Aldrich)
RBC-Lysis-Solution (Sigma-Aldrich)
TE-Puffer (Promega, Mannheim, Deutschland)
TriDye 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, U.S.A.)
Tris-HCl pH 8,0 (Merck)

2.2. Lösungen und Puffer

Antifade

230 mg DABCO
800 µl Aqua dest.
200 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0
9 ml Glycerol

DAPI-Gebrauchslösung

6 µl DAPI
60 ml 2x SSC

Gel-Loading-Puffer

0,125g Bromo-Phenol Blau
28,7g Glycerol Reagent Plus
Auf 100 ml Aqua dest. auffüllen

Paraformaldehyd 1% in H₂O

1g Paraformaldehyd
in 60 ml Aqua dest. lösen
5 Tropfen 10 N NaOH
unter dem Abzug erhitzen, bis die Lösung klar wird
auf pH 7,0-7,5 einstellen
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen, bei 4°C lichtgeschützt lagern

PBS (phosphate buffered saline) (10x)

80 g NaCl
2 g KCl
6,1 g Na₂HPO₄
2 g KH₂HPO₄
mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und gelöst auf pH 7,3 einstellen

Protease (Verdaulösung 1+2)

5 mg/10 mg Pepsin
0,5 ml 2 N HCl in 99,5 ml Aqua dest. lösen

20x SSC

175,3g NaCl
88,2g Na₃Citrat
in 800 ml Aqua dest. lösen
mit HCL auf pH 7,0 einstellen
mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

2x SSC

2 ml 20x SSC
100 µl Igepal CA-630
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

1x TBE

108g Trishydroxymethylaminomethane (TRIS)
55g Borsäure
40ml EDTA 0,5 M, pH 8,0
auf 1000 ml mit Aqua dest. Auffüllen

10x TBE

1x TBE mit Aqua dest. 1:10 verdünnen

2.3. Kits

MinElute 96 UF PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

Montage SEQ 96 Sequencing reaction Cleanup Kit (Milipore, Bilerica, U.S.A.)

2.4. Geräte

Accu-Jet Pipettierhilfe (Brand, Wertheim, Deutschland)

Bio Doc Analyzer (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit Kamera, Monitor, PC und Drucker

Biofuge primoR (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Brutschrank Function Line (Heraeus)

Elektrophoresekammer mit Gel-Gießrahmen, Probenkämme und Spannungsversorger

- 50 ml, Hoefer HE33 (Amersham Biosciences, Amersham, U.K.)
- 300 ml Modell 41-2025 (PeqLab, Erlangen, Deutschland)
- El. Phor.-Powerpack P24 (Biometra)

Electrophoresis Power supply ST606 (GIBCO BRL life Technologies, Carlsbad, U.S.A.)

Fluoreszenzmikroskope: Zeiss-Axioskop, Zeiss-Axioplan und Zeiss-Axio-Imager (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Fluoreszenzfilter (Fa. AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland)

3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
Hybridisierungssofen (Biometra)
Laborzentrifuge Universal 16 (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)
Lichtmikroskop 476012 (Zeiss)
Megafuge 1. OR (Heraeus)
NanoDrop ND-1000 (PeqLab)
Plattenschüttler MS3 Basic (IKA, Staufen, Deutschland)
Speedvac RC1010 (Jouan, Winchester, U.S.A.)
Thermocycler 3000 (Biometra)
Vakuumpumpe Multiscreen HTS Vacuum Manifold (Milipore)
VP2000 Processor (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, U.S.A.)
Wasserbad (Labortechnik Köttermann, Hänigsen, Deutschland)

2.5. Untersuchtes Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Zellen aus asserviertem Knochenmarkspunktat von 55 Patienten gearbeitet, welche mit DMSO kryokonserviert wurden sowie fixierten Zellen des gleichen Materials. Die Proben der Patienten wurden aus dem Archiv des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig–Holstein, Campus Kiel (UKSH Kiel) im Rahmen der Routinediagnostik-Untersuchungen entnommen. Bei allen Patienten bestand aufgrund von Blutbildveränderungen wie einer Bi- oder Panzytopenie der hochgradige Verdacht auf eine myeloische Neoplasie, in einigen Fällen bestand bereits eine Diagnose.

2.6. Einschlusskriterien des Patientenkollektivs zur Untersuchung

Bei 50 der untersuchten Fälle handelt es sich um Ersteinsendungen beim Verdacht auf eine myeloische Neoplasie zur tumorgenetischen Routinediagnostik an das Institut für Humangenetik, UKSH Kiel. Die Fälle wurden anhand folgender Kriterien retrospektiv aus der Patientendatenbank ausgewählt, über einen Zeitraum von 2007 bis 2011. Dieses Kollektiv wurde mit den molekularzytogenetischen Analysen von fünf weiteren myeloischen Neoplasien über einen Zeitraum von 2016 bis 2018 ergänzt, diese wiesen zum Teil auch mittels Sanger-Sequenzierung und *Next-Generation-Sequencing* (NGS) gesicherte *TET2*-Mutationen auf.

- a) Vorliegen einer Einverständniserklärung des Patienten für die wissenschaftliche Nutzung ihrer Probe
- b) Berücksichtigung nur von Ersteinsendungen bei der Verdachtsdiagnose einer myeloischen Neoplasie oder bestätigter Erkrankung

- c) Etwa die Hälfte der Fälle sollte einen unauffälligen Befund in der Chromosomen-Bänderungsanalyse der Routinediagnostik vorweisen
- d) Die andere Hälfte der Fälle sollte einen auffälligen Befund mit klonalen Chromosomenveränderungen in der Chromosomen-Bänderungsanalyse der Routinediagnostik vorweisen
- e) Ausreichende Verfügbarkeit von DMSO-Proben und fixierten Zellen ausschließlich aus Knochenmarkspunktat
oder
- f) Mittels NGS oder Sanger-Sequenzierung gesicherter *TET2*-Mutationen und a), b) ebenfalls zutreffend

2.7. Positive und Negative Kontrollen der eingesetzten Sonden

Für die Positiv- und Negativkontrollen der nicht etablierten Sonden „On MDS 7q-/SE 7 Triple-Color“ , „CL *TET2* Deletion Probe“, „On PDGFR β Break“ und „LSI D20S108 Spectrum Orange Probe“ wurden fixierte Zellen aus dem peripheren Blut freiwilliger Probanden mit normalem Karyotyp genutzt und im Falle der Positivkontrollen passende Fälle aus der Routinediagnostik ausgewählt.

2.8. Literaturrecherche

Das Patientenkollektiv wurde aufgrund der Seltenheit von *TET2*-Deletionen bei myeloischen Neoplasien durch eine Recherche mit weiteren Fällen aus der Literatur erweitert. Auf „PubMed“ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, Zugriffen am 02.06.2017) wurde nach den Stichworten „*TET2*-Mutation“ und Deletion sowie nach „*TET2*-Mutation“ und „myeloischer Neoplasie“ gesucht. Es wurden die zur Verfügung gestellten Anhänge und der vollständige Text der Publikationen zur Informationsgewinnung genutzt. Bei fehlenden Informationen und unvollständigen Angaben wurden die Autoren nicht kontaktiert, die Daten wurden übernommen in der dargebotenen Vollständigkeit.

Die Recherchen ergaben ein Kollektiv von 141 Fällen mit *TET2*-Mutationen, die in Tabelle 39 zusammengefasst sind. Die publizierten Daten mit einer Missensemutation wurden zusätzlich nochmals mit „PolyPhen-2“ auf ihre Malignität hin untersucht. Missensemutationen mit einem Score, der auf eine benigne Veränderung hindeutet, sind nicht in die Statistik eingegangen.

2.8.1. Einschlusskriterien für Fälle aus der Literatur

Es wurden zwei Gruppen gebildet. Für diese bestanden folgende Einschlusskriterien:

- a) Angabe einer Diagnose einer myeloischen Neoplasie
- b) Vorhandensein einer oder mehrerer *TET2*-Mutationen mit mindestens Angabe einer Veränderung auf Proteinlevel

- c) Sequenzierung der Fälle erfolgte für den vollständigen kodierenden Bereich des Genes *TET2*, Isoform A, NM 001127208.2 (Zugegriffen am 16.11.2017)
 - d) Bestehender Zusammenhang von Mutationen und grundlegenden Patientendaten
 - g) Deletion eines *TET2*-Allels nachgewiesen durch FISH, SNP-Array oder Zytogenetik sowohl kryptisch als auch mikroskopisch
- oder
- e) Wenn möglich nachgewiesene Heterozygotie von *TET2* durch FISH, SNP-Array oder Zytogenetik, wenn Teil einer Studie mit Kriterium e) auch unbekannter Allelstatus

2.9. Eingesetzte FISH-Sonden

Für ein Screening nach *TET2*-Veränderungen und weiteren für myeloische Neoplasien charakteristischen Veränderungen wurden das in Tabelle 2 aufgezeigte Sondenpanel genutzt. Die Namen und Spezifikationen entsprechen den vor 8 Jahren genutzten Sonden, sollte aktuell ein analoges Produkt unter neuem Namen verfügbar sein, ist dieser mit aufgeführt. Im Folgenden werden jedoch der Übersichtlichkeit halber die alten Bezeichnungen verwendet.

Tabelle 2. Eingesetztes Sondenpanel. Beschreibung der im Labor verwendeten Abkürzungen der Sonden, die vollständige Bezeichnung, Lokalisation und den Hersteller zum Zeitpunkt der Nutzung (Jahr 2011 bis 2013). Mit erwähnt wird in Klammern ggf. ein aktuellerer Produktname.

Nr.	Abkürzung der Sonde	Vollständiger Name + Design, ggf. neuer Name	Hersteller
1	TET2	CL TET2 Deletion Probe (<i>XL TET2 Deletion Probe</i>)	Metasystems, Altlussheim, Deutschland
		<i>Grün = 4q12 (310kb); Rot = 4q24 (TET2, 260kb)</i>	
2	5q31	LSI EGR1 (<i>Vysis EGR1 Fish Probe Kit</i>)	Abbott-Vysis, Wiesbaden, Deutschland
		<i>Grün = 5p15.2 (D5S23, D5S721, 450kb); Orange = 5q31 (EGR1, 200kb)</i>	
3	PDGFRB	On PDGFR β Break (<i>PDGFRB 5q32 Break</i>)	Kreatech, Amsterdam, Niederlande
		<i>Grün = 5q33.2 (D5S2014); Rot = 5q33.2 (D5S1907)</i>	
4	7q-	On MDS 7q-/SE 7, Triple-Color	Kreatech
		<i>Grün = 7q22 (200kb); Rot = 7q35 (320kb); Blau = SE 7 (Zentromer)</i>	
5	11q23	MLL BAP Dual Color LSI (<i>Vysis LSI MLL Dual Color</i>)	Abbott-Vysis
		<i>Grün = 11q23 (D11S1341, 350kb); Orange = 11q23 (D11S614, 190kb)</i>	
6	13q21	PN 13/21	Kreatech
		<i>Grün = 13q14 (RB1, 900kb); Rot = 21q22.1 (RCAN1, 360kb)</i>	
7	p53	On p53/MPO "ISO 17q" (<i>TP53/MPO ISO 17q</i>)	Kreatech
		<i>Grün = 17p13 (p53, 330kb); Rot = 17q23 (MPO, 400kb)</i>	
8	20q-	LSI D20S108 SpectrumOrange Probe	Abbott-Vysis
		<i>Rot = 20q12 (201kb)</i>	

9	t(8;21)	RUNX1T1/RUNX1 (AML/ETO) (<i>LSI RUNX1 and RUNX1T1 Dual Color</i>)	Abbott-Vysis
		<i>Grün = 21q22 (RUNX1, 1,4Mb); Orange = 8q21.3 (RUNX1T1, 655kb)</i>	
10	X/Y/18	X/Y/18-Zentromersonde (<i>AneuVysion Multicolor DNA Probe</i>)	Abbott-Vysis
		<i>Grün = X; Rot = Y; Blau = 18</i>	

3. Methoden

Die Methoden folgen im Üblichen den Standardarbeitsanweisungen des Institutes für Humangenetik, UKSH Kiel.

3.1. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Ziel der Anwendung der FISH-Technik ist der Nachweis von Chromosomenveränderungen, numerisch und strukturell. Es handelt sich um eine molekularzytogenetische Methode zur farbigen Darstellung von Chromosomen und Chromosomenabschnitten. Das Untersuchungsmaterial muss auf einen Objektträger aufgebracht, verdaut, denaturiert und mit einem Sondenmix hybridisiert werden. Nach mehreren Waschschritten, einer Gegenfärbung der DNA und einer Behandlung mit Antifade kann eine Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Filtern erfolgen.

3.1.1. *FISH*

Die fixierten Zellen der 50 in dieser Arbeit untersuchten Fälle wurden auf Objektträger für das beschriebene Sondenpanel aufgetropft, nie mehr als eine Probe je Träger. Vor dem Verdau wurden die OT unter dem Auflichtmikroskop nach geeigneten Hybridisierungsfeldern durchsucht, dort sollten möglichst viele Einzelzellen bzw. Metaphasen in einem Blickfeld sein. Danach wurde mit einem Diamantschreiber ein 10 mm großer Kreis auf der Rückseite darum gezogen.

Verdau und Fixierung:

Die OT wurden nun in den Präparateständer des VP 2000 gestellt, dieser auf 37°C vorgeheizt und das Programm „Protease-Verdau“ gestartet. Dieses automatisierte Programm beinhaltet: Inkubation in Pepsin-Lösung 5 min bei 37 °C, 1 min waschen in Aqua dest., Fixierung der Zellen bei 2 min in 1 % Paraformaldehydlösung, nochmals 1 min waschen in Aqua dest. und Dehydrierung der Zellen je 2 min in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 80 %, absolutes Ethanol) sowie Lufttrocknung zum Abschluss.

Hybridisierung:

Im Anschluss konnte für die Hybridisierung der Sonden jeweils 1,3 µl Sondenmix auf die markierten Hybridisierungsfelder pipettiert werden. Nach dem Aufbringen eines Deckgläschens und Herausdrücken von Luftbläschen wurden die Ränder mit reichlich Fixogum luftdicht verschlossen. Es erfolgte eine Denaturierung bei 75°C in einer feuchten Metallbox im Wasserbad für 10 Minuten.

Anschließend waren die Objektträger 12-72 Stunden, im Falle dieser Arbeit 20 Stunden, bei 37°C zur Hybridisierung im Brutschrank.

Waschen und Gegenfärbung:

Zum Waschen und Gegenfärben der OT erfolgte die Entfernung des Fixogums mit den Deckgläsern. Die OT wurden wieder in den Präparateständer des VP 2000 gestellt, auf 75°C vorgeheizt und das Programm „Routine-Waschen“ gestartet. Dieses Programm beinhaltet:

SSC-Lösung 1 bei 70 °C für 1 min, bei Raumtemperatur 1 min in SSC-Lösung 2, kurz spülen in 2x SSC-Lösung, Gegenfärbung mit DAPI-Lösung für 5 min und abschließendes Spülen in 2x SSC-Lösung. Nach Beendigung des Waschvorgangs blieben die Präparate im 2x SSC, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach Applikation von zwei Tropfen Antifade konnten die OT eingedeckt werden.

3.1.2. Auswertung FISH

Die Fluoreszenz-Signale wurden mit oben genannten Fluoreszenzmikroskopen mit entsprechenden Filtern ausgewertet. Die Darstellung und Dokumentation erfolgte im ISIS-Programm (Metasystems, Altussheim, Deutschland). Veränderungen von Genen, die durch FISH detektiert werden können sind je nach Sondendesign Translokationen, Duplikationen, Amplifikationen und Deletionen.

Bei der *TET2*-Sonde handelt es sich um eine „Deletion-Probe“, die roten Signale binden an 4q24, einer typischen Region für eine *TET2*-Deletion, die grünen Signale oberhalb davon an 4q12. Eine normale Zelle enthält von jedem Gen zwei intakte Kopien, es zeigen sich zwei grüne und zwei rote Signale. Bei einer Deletion des *TET2*-Genortes weist die Signalkonstellation zwei grüne und ein rotes Signal auf (Abbildung 5).



Abbildung 5. Signalkonstellationen der *TET2*-Sonde. Links zu sehen ist die Signalkonstellation bei zwei intakten Kopien des *TET2*-Lokus. Rechts dagegen den typischen Befund bei einer Deletion eines *TET2*-Lokus.

Ebenfalls eine „Deletion-Probe“ ist die in dieser Arbeit verwendete 7q-Sonde. Das grüne Signal bindet hier bei 7q22, das rote bei 7q35. Beides sind kritische Regionen des 7q-Armes. Zusätzlich dazu ist ein blaues Kontrollsignal integriert, welches an das Zentromer des Chromosoms 7 bindet. Typische Signalkonstellationen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3. Erwartete Signalkonstellationen der "On MDS 7q- -Sonde". Erwartete Signalkonstellationen der On MDS 7q-/SE 7, Triple-Color-Sonde von Kreatech sowie häufigste Veränderungen.

"On MDS 7q-"	Normal	del(7q22)/ del(7q35)	del(7)(q35)	del(7)(q22)
Erwartete Signale	2R+2G+2B	1R+1G+2B	1R+2G+2B	2R+1G+2B

R=rotes Signal, G=grünes Signal. B=blaues Signal.

Die *PDGFRB*-Sonde ist eine sog. „*Break-Apart-Probe*“. Sie soll Translokationen im Bereich 5q33 darstellen. Dazu binden ein grünes und ein rotes Signal direkt nebeneinander an 5q33, sodass ein gelbes Fusionsignal entsteht. Splittet sich dieses mehr als ein Signal-Diameter auf, ist von einem Bruchereignis auszugehen (Tabelle 4).

Tabelle 4. Erwartete Signalkonstellationen der "On PDGFR β-Sonde". Erwartete Signalkonstellation der On PDGFR β (5q33) Break-Apart-Sonde von Kreatech sowie häufigste Veränderungen.

"On PDGFR β"	Normal	5q33 Split	del(5)(q33)
Erwartete Signale	2F	1F+1R+1G	1F

R=rotes Signal, G=grünes Signal. B=blaues Signal.

Die 20q-Sonde soll eine mögliche Deletion des langen Armes von Chromosom 20 detektieren, dazu bindet ein rotes Signal an 20q12. Bei einer Deletion ab diesem kritischen Bereich fehlt eines der roten Signale (Tabelle 5).

Tabelle 5. Erwartete Signalkonstellation der "20q- -Sonde". Erwartete Signalkonstellation der LSI D20S108 SpectrumOrange-Probe von Abbott-Vysis und eine häufige Veränderung

"20q-"	Normal	del(20)(q12)
Erwartete Signale	2R	1R

R=rotes Signal.

Die X/Y/18-Sonde soll im Zusammenhang mit dieser Thematik den Verlust vom Y-Chromosom detektieren. Das blaue Signal fungiert als Kontrollsignal und bindet an das Zentromer von Chromosom 18. Das grüne Signal bindet an das Zentromer des X-Chromosoms, das rote Signal an das Zentromer des Y-Chromosoms. Der Verlust des Y-Chromosoms wird durch ein fehlendes rotes Signal angezeigt (Tabelle 6).

Tabelle 6. Erwartete Signalkonstellation der "X/Y/18-Sonde". Erwartete Signalkonstellation der X/Y/18-Sonde von Abbott-Vysis und die häufigste Veränderung.

"X/Y/18"	Normal	Verlust des Y-Chromosoms
Erwartete Signale	1R+1G+2B	0R+1G+2B

R=rotes Signal, G=grünes Signal. B=blaues Signal.

Die P53-Sonde soll Deletionen von *TP53*, Zugewinne von *MPO* und das Vorliegen eines Isochromosoms 17q zeigen. Das grüne Signal bindet an *TP53* (17p13) und das rote Signal an *MPO* (17q23). Im Falle eines Verlustes von *TP53* zeigt sich nur ein grünes Signal, bei Zugewinn von *MPO* mehr rote Signale (Tabelle 7).

Tabelle 7. Erwartete Signalkonstellationen der "p53-Sonde". Erwartete Signalkonstellation der On p53/MPO „ISO17q“-Sonde von Kreatech.

"p53"	Normal	del(17)(p13)	17q23-Zugewinn	i(17)(q10)
Erwartete Signale	2R+2G	2R+1G	3R+2G	3R+1G

R=rotes Signal, G=grünes Signal.

Die 13q;21q-Sonde wird eingesetzt um Zugewinne und/oder Verluste der Chromosomen 13 und 21 zu detektieren. Das rote Signal bindet an die Region 21q22, bei einer Trisomie 21 sind 3 rote Signale zu sehen. Das grüne Signal bindet an 13q14, bei einer Trisomie 13 sind 3 grüne Signale oder beim Verlust des *RB1*-Gens ein grünes Signal zu erkennen (Tabelle 8).

Tabelle 8. Erwartete Signalkonstellationen der "13q;21q-Sonde". Erwartete Signalkonstellation der PN13(13q14)/PN21(21q22)-Sonde von Kreatech.

"13q;21q"	Normal	+21	+13	del(13)(q14)
Erwartete Signale	2R+2G	3R+2G	2R+3G	2R+1G

R=rotes Signal, G=grünes Signal.

Die 11q23-Sonde ist eine „*Break-Apart-Probe*“, sie soll Translokationen im Bereich des *MLL*-Gens detektieren. Das rote und grüne Signal binden überlappend in der 11q23 Region und bilden ein gelbes Fusionssignal. Kommt es zu einem Aufsplitten des Fusionssignales auf mehr als einen Diameter, liegt ein *MLL*-Bruch vor. Sollte eine Region 11q deletiert sein, ist nur ein Fusionssignal zu sehen. (Tabelle 9).

Tabelle 9. Erwartete Signalkonstellation der "11q23-Sonde". Erwartete Signalkonstellation der MLL BAP Dual Color-Sonde von Abbott-Vysis.

"11q23"	Normal	11q23-Bruch	del(11)(q23)
Erwartete Signale	2F	1F+1R+1G	1F

R=rotes Signal, G=grünes Signal. F=Fusionssignal.

Die t(8;21)-Sonde ist eine "Fusion-Probe". Sie soll das Fusionsgen *RUNX1/RUNX1T1* (auch *AML1/ETO* genannt) nachweisen, welches bei einer t(8;21) entsteht. Das rote Signal bindet an 8q21.3 (*RUNX1T1*), das grüne Signal an 21q22 (*RUNX1*). Typischerweise zeigen sich bei einer t(8;21) ein grünes, ein rotes und zwei gelbe Fusionssignale. Auch die Trisomien 8 und 21 sind zu detektieren (Tabelle 10).

Tabelle 10. Erwartete Signalkonstellation der "t(8;21)-Sonde". Erwartete Signalkonstellation der LSI *RUNX1T1/RUNX1* Dual Color Fusion-Probe von Abbott-Vysis.

"t(8;21)"	Normal	+8	+21	t(8;21)
Erwartete Signale	2R+2G	3R+2G	2G+3R	1R+1G+2F

R=rotes Signal, G=grünes Signal. F=Fusionssignal.

Die 5q31-Sonde soll eine Deletion im Bereich des *EGR1*-Genes darstellen. Das rote Signal bindet an 5q31, das grüne Signal an 5p15.2. Bei einer Deletion des *EGR1*-Genes fehlt ein rotes Signal (Tabelle 11).

Tabelle 11. Erwartete Signalkonstellation der "5q31-Sonde". Erwartete Signalkonstellation der LSI EGR1-Sonde von Abbott-Vysis.

"5q31"	Normal	del(5)(q31)
Erwartete Signale	2R+2G	1R+2G

R=rotes Signal, G=grünes Signal.

3.1.3. Kontrollen und Ermittlung einer Nachweisgrenze für die FISH Analysen

Negativ- und Positivkontrollen wurden durchgeführt für die „CL TET2 Deletion Probe“, „LSI D20S108 SpectrumOrange Probe“, „On PDGFR β Break Probe“ und „On MDS 7q-/SE 7, Triple-Color Probe“. Die restlichen Sonden des Panels sind im Rahmen der Routinediagnostik des Institutes für Humangenetik, UKSH Kiel, validiert. Die Nachweisgrenze wurde festgelegt auf 5%, je Sonde und Fall wurden 100 Zellen ausgezählt.

Als Positivkontrollen für die *TET2*-Sonde wurden aus der laufenden hämatologischen Routinediagnostik zwei Fälle mit Trisomie 4 sowie ein Fall mit Monosomie 4 verwendet. Proben mit gesicherten Deletionen der entsprechenden Region waren zum Zeitpunkt der Validierung noch nicht verfügbar. In Tabelle 12 aufgeführt sind die in der FISH erhobenen Signalkonstellationen. Alle Positivbefunde wurden gesehen, in den Negativkontrollen blieben die auffälligen Signalkonstellationen unter der gewählten Nachweisgrenze von 5 %.

Tabelle 12. „TET2“-Positiv- und Negativkontrollen. Der obere Abschnitt enthält die „TET2“-Positiv- und der untere Abschnitt die Negativkontrollen jeweils mit dem erwarteten Ergebnis.

Positivkontrolle	Signal	Anzahl
1. TET2	2R+2G	36
Trisomie 4	3R+3G	60
	2R+1G	2
	4R+3G	1
	1R+1G	1
2. TET2	2R+2G	83
Trisomie 4	2R+1G	5
	3R+3G	12
3. TET2	2R+2G	87
Monosomie 4	1R+1G	12
	1R+2G	1
Negativkontrolle	Signal	Anzahl
1. TET2	2R+2G	97
Unauffällig	2R+1G	2
	1R+2G	1
2. TET2	2R+2G	98
Unauffällig	2R+1G	1
	1R+1G	1
3. TET2	2R+2G	99
Unauffällig	2R+1G	1

R=rotes Signal, G=grünes Signal.

Für die Positivkontrollen der On MDS 7q- Sonde waren die zu erwartenden Fälle von zweimal del(7q22) und einmal Monosomie 7 gesehen worden (Tabelle 13). Auch die erste nur in geringer Anzahl vorhandener del(7q22) wurde knapp nachgewiesen. Die Negativkontrollen der On MDS 7q- Sonde blieben mit insgesamt 4% auffälligen Befunden unter der Nachweisgrenze.

Tabelle 13. „On MDS 7q-“, Positiv- und Negativkontrollen. Der obere Abschnitt enthält die „On MDS 7q-“ Positiv - und der untere Abschnitt die Negativkontrollen jeweils mit dem erwarteten Ergebnis.

Positivkontrolle	Signal	Anzahl
1. On MDS 7q-	2R+2G+2B	93
<i>Del(7q22)</i>	2R+1G+2B	6
	1R+2G+2B	1
2. On MDS 7q-	2R+2G+2B	33
<i>Del(7q22)</i>	2R+1G+2B	62
	1R+2G+2B	2
	1R+1G+1B	3
3. On MDS 7q-	2R+2G+2B	76
<i>Monosomie 7</i>	1R+1G+1B	24
Negativkontrolle	Signal	Anzahl
1. On MDS 7q-	2R+2G+2B	96
<i>Unauffällig</i>	2R+2G+1B	2
	1R+1G+2B	2
2. On MDS 7q-	2R+2G+2B	95
<i>Unauffällig</i>	1R+1G+2B	4
	1R+2G+2B	1
3. On MDS 7q-	2R+2G+2B	96
<i>Unauffällig</i>	1R+1G+2B	1
	1R+2G+2B	2
	2R+1G+2B	1

R=rotes Signal, G=grünes Signal. B=blaues Signal.

Die Signalkonstellationen der del(20q) Positivkontrollen zeigten die erwartete del(20q12) in allen drei ausgewählten Fällen (Tabelle 14). Die del(20q) Negativkontrollen zeigten auffällige Signalkonstellationen deutlich unter der Nachweisgrenze.

Tabelle 14. „20q-“ Positiv- und Negativkontrollen. Der obere Abschnitt enthält die „20q-“ Positiv- und der untere Abschnitt die Negativkontrollen jeweils mit dem erwarteten Ergebnis.

Positivkontrolle	Signal	Anzahl
1. 20q-	2R	17
<i>Del(20q12)</i>	1R	83
2. 20q-	2R	82
<i>Del(20q12)</i>	1R	12
	3R	6
3. 20q-	2R	49

Del(20q12)	1R	50
	3R	1
Negativkontrolle	Signal	Anzahl
1. 20q-	2R	97
Unauffällig	1R	3
2. 20q-	2R	98
Unauffällig	1R	2
3. 20q-	2R	100
Unauffällig		

R=rotes Signal.

Für die *PDGFRB* Sonde wurden Fälle von 5q-Deletionen aus der hämatologischen Routinediagnostik ausgewählt, gesicherte Fälle von Bruchereignissen in 5q33 waren zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar. Ein Signal wurde als Splitsignal gewertet, wenn es mehr als ein Diameter voneinander entfernt lag (Tabelle 15). Die zu erwartenden Ergebnisse sind deutlich über der Nachweisgrenze von 5%. Auffällige Befunde in den Negativkontrollen der *PDGFRB* Sonde blieben unter der Nachweisgrenze.

Tabelle 15. „PDGFRB“ Positiv- und Negativkontrollen. Der obere Abschnitt enthält die „PDGFRB“ Positiv- und der untere Abschnitt die Negativkontrollen jeweils mit dem erwarteten Ergebnis.

Positivkontrolle	Signal	Anzahl
1. PDGFRB	2F	67
Del 5q-	1F+1R+1G	2
	1F	30
	3G+4R	1
2. PDGFRB	2F	2
Del 5q-	1F	92
3. PDGFRB	2F	2
Del 5q-	1F	97
	1R+1G	1
Negativkontrolle	Signal	Anzahl
1. PDGFRB	2F	96
Unauffällig	1F+1R+1G	2
	1F	2
2. PDGFRB	2F	98
Unauffällig	1F+1R+1G	2
3. PDGFRB	2F	98
Unauffällig	1F+1R+1G	2

R=rotes Signal, G=grünes Signal. F=Fusionssignal.

3.2. Sanger-Sequenzierung

Zunächst wurde aus den in DMSO-asservierten Knochenmarkszellen die genomische DNA extrahiert, anschließend erfolgte eine Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mit dem NanoDrop ND-1000. Danach wurde eine PCR mit den verschiedenen Primerpaaren

durchgeführt und das Ergebnis durch Darstellung des Produktes mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft sowie aufgereinigt. Es wurde eine Sequenzierungsreaktion mit dem „Big Dye Terminator“ und jeweils dem Vorwärts- und Rückwärtsprimer einzeln durchgeführt, anschließend aufgereinigt. Mit dem 3130 Genetic Analyzer erfolgte die Sequenzierung. Das Ergebnis wurde anschließend anhand der bekannten Sequenz des *TET2*-Genes auf Mutationen überprüft.

3.3. Durchführung DNA-Extraktion

Die DNA wurde in 6 Schritten aus dem Ausgangsmaterial isoliert: Lyse der Erythrozyten, Lyse der Leukozyten, Proteinverdau, Proteinfällung, DNA-Präzipitation, Elution der DNA.

Nach Auftauen der Proben bei ca. 37°C und wurden sie zügig weiterverarbeitet, um das toxische DMSO zu entfernen. Dazu wurden 3 ml Knochenmark in DMSO in ein 15 ml-Röhrchen überführt, mit 9 ml RBC-Lösung versetzt und durch mehrfaches Schwenken des Röhrchens gemischt. Anschließend wurde 5-10 min bei 1500U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimalig mit RBC-Lösung gewaschen, bis eine weißliche Färbung sichtbar wird. Das Pellet wurde in 3 ml Cell Lysis Puffer resuspendiert und die Zellsuspension 16-72 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Probe sollte nun auf RT abkühlen, dann wurde 1 ml Protein-Precipitation-Lösung zum Lysat gegeben, 1 min gevortext und diese anschließend mindestens 10 min auf Eis gestellt.

Nun wurde 15-30 min bei 4500 U/min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Röhrchen überführt, dieser sollte klar sein. Zum klaren Überstand wurde die gleiche Menge Isopropanol gegeben, die DNA fiel durch Schwenken des Röhrchens als weißer Faden aus. Sie wurde in ein 1,5 ml Tube mit 500 µl 70%igem Ethanol überführt, gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde in der Speedvac 10-20 min getrocknet und je nach Pelletgröße in einer entsprechenden Menge Aqua dest. gelöst.

Das Pellet sollte sich mindestens 16 Stunden bei RT lösen, danach wurde eine DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop ND-1000 durchgeführt.

3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Der NanoDrop ND-1000 ist ein Spectrophotometer zur Bestimmung der Konzentration von Lösungen anhand der optischen Dichte. Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wird die Dichte gegen eine Referenz-Lösung (TE-Puffer) gemessen. Außerdem wird die Reinheit mitbestimmt, diese wird bestimmt durch das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm. Der Quotient A260/A280 sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Die DNA-Konzentration sollte über 100 ng/µl liegen, bei Werten über 1000 ng/µl wurde mit Aqua dest. verdünnt.

3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Primer

Primer:

Es wurde als Grundlage folgende mRNA-Sequenz verwendet: „*Homo sapiens tet oncogene, family member 2 (TET2), transcript variant 1*, mRNA, locus NM 001127208 (9796 bp mRNA linear)“. Die Referenznummer lautet NM 001127208, Version NM 001127208.2 (Accession am 11.06.2016). Die in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare sind tabellarisch aufgeführt und wurden für die Amplifikation und Sequenzierung der kodierenden Exone 3-11 sowie des Exons 2 der *TET2* Isoform A etabliert (Tabelle 16).

Tabelle 16. Auflistung der verwendeten Primer für das *TET2*-Gen und ihre Lokalisation.

Laborinterne Nr.	Richtung	Lokalisation	Sequenz
Primer 8094	Vorwärts (F)	Exon 2	AAACATTTCAGCAGCACACCC
Primer 8085	Rückwärts (R)	Exon 2	GGTAATCTCTCTCCAAACTTCAA
Primer 8096	Vorwärts (F)	Exon 3	CAGTTTGCTATGTCTAGGTATTCCG
Primer 8097	Rückwärts (R)	Exon 3	CAACCAAATGTCTCCGATTTG
Primer 8098	Vorwärts (F)	Exon 3	GAAACAAGACCAAAAGGCTAATG
Primer 8099	Rückwärts (R)	Exon 3	GCAGTGGTGAGTGAGGCCT
Primer 8100	Vorwärts (F)	Exon 3	AAATGCCATTACAGTCAGGC
Primer 8101	Rückwärts (R)	Exon 3	CTCTGAATGGTGGAGTTTTAGAAG
Primer 8102	Vorwärts (F)	Exon 3	TCTGCCACTACCACACCACC
Primer 8103	Rückwärts (R)	Exon 3	CTCGTTTTACCAAGCGGA
Primer 8104	Vorwärts (F)	Exon 3	TGAAGGGTCGAGACAAGGAG
Primer 8105	Rückwärts (R)	Exon 3	CCTTTTGCAACATAAGCCTCA
Primer 8106	Vorwärts (F)	Exon 3	TTTCAACAAAGAGCAGATTCCC
Primer 8107	Rückwärts (R)	Exon 3	CCAAAACCTTGATCACATGC
Primer 8108	Vorwärts (F)	Exon 3	TGCATGCAAAATACAGGTTTC
Primer 8109	Rückwärts (R)	Exon 3	GAGAATCCACCTGCAAGCTG
Primer 8110	Vorwärts (F)	Exon 3	GATGCACAGGCCAATTAAGG
Primer 8111	Rückwärts (R)	Exon 3	GCAAATTTTATCTTCAGATATGGGA
Primer 8112	Vorwärts (F)	Exon 3	GATAGCCACACCCCAGCTT
Primer 8113	Rückwärts (R)	Exon 3	TTTTCCCTCTCTTCAGATCCTG
Primer 8114	Vorwärts (F)	Exon 4	GCCCTTAATGTGTAGTTGGGG
Primer 8115	Rückwärts (R)	Exon 4	CAGCCTTCACACACAAAGCA
Primer 8116	Vorwärts (F)	Exon 5	TGTTCAAATATTTTGATTGCCTC
Primer 8117	Rückwärts (R)	Exon 5	CCCTGAGAATTGGGTTACCC
Primer 8118	Vorwärts (F)	Exon 6	GCCCTTATCTGCTGCAAGTG
Primer 8119	Rückwärts (R)	Exon 6	GAAAGCCCAATCTTTGGTTGA
Primer 8120	Vorwärts (F)	Exon 7	TGTGGTTATGCCACAGCTTAATAC
Primer 8121	Rückwärts (R)	Exon 7	CCTCTTTGGTCTTTTATGTTAATTCC
Primer 8122	Vorwärts (F)	Exon 8	TGGGATTCAAAATGTAAGGGG
Primer 8123	Rückwärts (R)	Exon 8	CTTAATTGTTGAAACCACTGCAG
Primer 8124	Vorwärts (F)	Exon 9	TGAATTATACAGGGGCATGAGG

Primer 8125	Rückwärts (R)	Exon 9	CATCTCATGTTGAGGAGCAGAA
Primer 8126	Vorwärts (F)	Exon 10	AACTAGGCCACCAACACAAAATC
Primer 8127	Rückwärts (R)	Exon 10	CCCCATCAACTTGTAAAGTTCTG
Primer 8128	Vorwärts (F)	Exon 11	CCTACATTTAAGTATCCTCACTAGCC
Primer 8129	Rückwärts (R)	Exon 11	GGTATCCAAGCCAAGACCCT
Primer 8130	Vorwärts (F)	Exon 11	ACCCTGGGCTTTTGAATCAG
Primer 8131	Rückwärts (R)	Exon 11	CCTGCATCTCCAAAACAAGG
Primer 8288	Vorwärts (F)	Exon 11	ACCACCCAATCTGAGCAATC
Primer 8132	Rückwärts (R)	Exon 11	CCAGGATCTCCCTCGTCTTT
Primer 8133	Vorwärts (F)	Exon 11	TCCAACCTCATGGGTCAATTCTC
Primer 8134	Rückwärts (R)	Exon 11	GGGCAGTGGGGAAAGGT

Die Sequenzen der R-Primer sind zur besseren Auffindbarkeit ebenfalls in 3'-5'-Richtung angegeben. Die echte Sequenz der rückwärts-gewandten Primer ist komplementär und in Gegenrichtung zu der hier angegebenen Basenabfolge.

PCR:

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können definierte DNA-Abschnitte mit hoher Spezifität und Sensitivität enzymatisch vervielfältigt werden. Als Ausgangsmaterial diente die extrahierte DNA aus dem Knochenmarkspunktaten. Die PCR beginnt mit einer thermischen Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Anschließend binden synthetische Oligonukleotide (Primer) an komplementäre Zielsequenzen, welche die gewünschte DNA-Region eingrenzen (Annealing). Die optimale Annealing-Temperatur ist dabei abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Eine hitzestabile DNA-Polymerase verwendet bei der Elongation die Primer als Startermoleküle und verlängert den Oligonukleotidstrang entlang des Templates nach dem Gesetz der komplementären Basenpaarung. Durch die zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte wird die zwischen den Primern liegende DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt.

Für die PCR wurde für je einen Vorwärts- und Rückwärtsprimer (bis einschließlich Primer 8127) mit einer Positiv- und Negativkontrolle folgender Reaktionsansatz gewählt (Tabelle 17):

Tabelle 17. Reaktionsansatz I für PCR. Darstellung eines Reaktionsansatzes für die PCR bis einschließlich Primer 8127.

Komponenten	Konzentration	Eingesetzte Menge
H ₂ O		83 µl
10x PCR Puffer II		12 µl
MgCl ₂	25 mM	9,6 µl
dNTPs	5 mM je Nukleotid	4,8 µl
F-Primer	20 mM/µl	2,4 µl
R-Primer	20 mM/µl	2,4 µl
AmplitaqGold Polymerase		1,0 µl

Die Primer 8128 bis 8134 lieferten in den ersten Anläufen nur ein schwaches Produkt, daher wurde hier der Reaktionsansatz nach Schema der Tabelle 18 modifiziert:

Tabelle 18. Reaktionsansatz II für PCR. Modifizierten Reaktionsansatz ab Primer 8128.

Komponenten	Konzentration	Eingesetzte Menge
H ₂ O		83 µl
10x PCR Puffer II		12 µl
MgCl ₂	25 mM	8,0 µl
dNTPs	5 mM je Nukleotid	6,0 µl
F-Primer	20 mM/µl	2,4 µl
R-Primer	20 mM/µl	2,4 µl
AmplitaqGold Polymerase		1,0 µl
Betain	1,25 µl je Ansatz	5,0 µl

Der Reaktionsansatz I lief mit folgendem Programm (Tabelle 19) im Thermocycler 3000 (Biometra):

Tabelle 19. Programm PCR I. Das für Reaktionsansatz I verwendete Programm des Thermocycler 3000 (Biometra).

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	36
Annealing	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Elongation	72 °C	5 min	1
Aufbewahrung	4 °C		

Der Reaktionsansatz II lief mit folgendem Programm (Tabelle 20) im Thermocycler 3000 (Biometra):

Tabelle 20. Programm PCR II. Das für Reaktionsansatz II verwendete Programm des Thermocycler 3000 (Biometra).

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	36
Annealing	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Elongation	72 °C	5 min	1
Aufbewahrung	4 °C		

3.6. Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde bei der hier erwarteten Fragmentlänge ein 2 %-iges Agarosegel gegossen. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in einem Erlenmeyer-Kolben mit TBE-Puffer je nach Probenanzahl auf 50 bzw. 300 ml aufgefüllt und

in einer Mikrowelle unter Kochen gelöst. Unter kaltem Wasser wurde die Lösung handwarm abgekühlt und mit 2,5 bzw. 15 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Das fertige Gel wurde in eine kleine (50 ml) oder große (300 ml) Gelkammer gegossen, mit passenden Taschenkämmen versehen und vollständig bei Raumtemperatur ausgehärtet.

Vor dem Auftragen der Proben wurden jeweils 10 µl des PCR-Produktes mit 3,5 µl Loading-Buffer versetzt und das Agarosegel in der Kammer vollständig mit 1x TBE bedeckt. Als Start wurde in die erste Tasche des Agarosegels TriDye 100 bp DNA Ladder als Längenstandard geben und anschließend das PCR-Ladepuffergemisch in die nachfolgenden Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte für 1 h bei 180 V. Dabei wurden die Netzgeräte El. Phor.-Powerpack P24 (Biometra) oder Electrophoresis Power supply ST606 (GIBCO BRL life Technologies) verwendet. Die PCR-Produkte wurden unter UV-Licht mit Hilfe des BioDoc Analyzers (Biometra) und der BioDoc Analyze Software Version 2.1 (Biometra) dokumentiert.

3.7. Aufreinigung des PCR-Produktes

Nach erfolgreicher Qualitätskontrolle durch die Gelelektrophorese wurde das PCR-Produkt durch Filtration aufgereinigt, um ungebundene Primer und Salze zu entfernen.

Es wurden je 15 µl PCR-Produkt auf 40 µl Aqua dest. gegeben, die Probe auf die Wellplatte des MinElute 96 UF PCR Purification Kit pipettiert, diese auf dem Halter für die Vakuumpumpe platziert und einen Druck von 23-25 mmHg angelegt. Nach vollständigem Absaugen der Lösung wurden Flüssigkeitsrückstände an der Unterseite mit Zellstoff entfernt, zum Waschen 50 µl Aqua dest. in jedes *Well* gegeben, erneut ein Vakuum anlegt und die Flüssigkeitsrückstände entfernt.

Nun wurden 20 µl Aqua dest. in jedes *Well* gegeben, die Platte mit Klebefolie abgedeckt und bei 1000-3000 U/min ca. 5 min auf dem Plattenschüttler geschüttelt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden umgefüllt und der Sequenzierungsreaktion zugeführt.

3.8. Durchführung Sequenzierungsreaktion und Aufreinigung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach dem Sanger-Verfahren, auch Kettenabbruchverfahren genannt. Hierbei werden in einem Sequenzierungsansatz enthaltene, markierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) zufällig in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Als DNA-Matrize dient dabei das in den vorherigen Schritten gewonnene PCR-Fragment. Die ddNTPs führen zu einem Kettenabbruch, sie kommen im Verhältnis zu den dNTPs in so geringer Konzentration vor, dass auch längere DNA-Einzelstränge entstehen können. Es wurde das Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, in diesem werden vier verschiedenfarbig Fluoreszenz-markierte ddNTPs eingesetzt. Die Reaktionsprodukte werden anschließend anhand ihrer Größe

kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Das Chromatogramm gibt direkt die Basensequenz des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

Sequenzreaktion:

Der Vorwärts- und Rückwärtsstrang eines PCR-Fragments wurde in zwei Sequenzierungsansätzen getrennt voneinander analysiert. Es wurde folgender Reaktionsansatz genutzt (Tabelle 21):

Tabelle 21. Ansatz Sequenzierungsreaktion. Darstellung des für die Sequenzierungsreaktion verwendeten Ansatzes.

Komponenten	Konzentration	Eingesetzte Menge
Big Dye Terminator Puffer (Applied Biosystems)	10x	2 µl
Big Dye Terminator (Applied Biosystems)		1 µl
Primer (Vorwärts/Rückwärts getrennt)	je 20 pmol/µl	2 µl
Amplifikat (gereinigt)		1 µl
dH ₂ O		ad 20 µl

Der Reaktionsansatz lief mit folgendem Programm (Tabelle 22) im Thermocycler 3000 (Biometra):

Tabelle 22. Programm Sequenzreaktion. Das für die Sequenzreaktion verwendete Programm des Thermocycler 3000 (Biometra).

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	96 °C	5 min	1
Denaturierung	96 °C	10 s	25
Annealing	55 °C	5 s	
Elongation	60 °C	4 min	
Aufbewahrung	4 °C		

Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion:

Anschließend musste die Reaktion wie das vorherige PCR-Produkt aufgereinigt werden.

Zur Sequenzierungsreaktion wurden 20 µl der zum Cleanup-Kit gehörigen Injektionslösung gegeben, vermischt und in ein Well der SEQ96-Platte des Kits pipettiert. Die Platte wurde auf dem Halter für die Vakuumpumpe platziert und einen Druck von 23-25 mmHg angelegt. Nachdem das Vakuum die Lösung vollständig durch die Membran der Platte gesaugt hatte, wurden Flüssigkeitsrückstände entfernt. Zum Waschen wurden wieder 20 µl Injektionslösung auf die Säule gegeben und erneut das Vakuum angelegt und die Flüssigkeitsrückstände entfernt.

Nach dem Waschen wurden 20 µl Aqua dest. auf den Boden der Wellplatte gegeben, mit Klebefolie abdeckt und ca. 5 min bei 1000-3000 U/min auf dem Plattenschüttler geschüttelt. Die gereinigten Proben wurden umgefüllt, zu 1/5 verdünnt und zur elektrophoretischen Analyse überführt.

3.9. Kapillarelektrophorese und Auswertung

Die aufgereinigten Sequenzreaktionsprodukte wurden luftblasenfrei in gerätespezifische Gefäße überführt, mit denen der Kapillarsequenzierer 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) beladen wurde. Das Gerät wurde mit der Run 3100-Avant Data Collection v2.0 Software (Applied Biosystems) bedient. Die Injektionszeit variierte in Abhängigkeit von der Konzentration der Sequenzreaktionsprodukte zwischen 5 und 10 s. Die Laufzeit betrug je nach erwarteter Fragmentlänge 18 oder 30 min. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit der Sequencing Analysing Software V.6.0. (Applied Biosystems).

Die Auswertung erfolgte anhand der Referenzsequenz NM 001127208.2, dies ist eine mRNA-Sequenz der vorherrschenden Isoform A des Proteins von *TET2*. Die Analyse und Identifikation von Mutationen erfolgten bidirektional. Veränderungen in Introns wurden nicht aufgeführt. Die Veränderungen in Exons wurden in folgenden Datenbanken und Websites auf bekannte Mutationen und SNPs abgeglichen: „*Blast* (NCBI; O'Leary et al., 2016)“, „*ExAC*“ (Broad Institute; Lek et al., 2016), „*ClinVar*“ (NCBI; Landrum et al., 2018), „*UCSC Genome browser*“ (UCSC; Kent et al., 2002). Die Proteinsequenz wurde aus der kodierenden Sequenz des Transkriptes und der Referenz mithilfe von „*Mutalyzer*“ berechnet (Wildeman et al., 2008). Diese wurde mit „*PolyPhen-2*“ (Sunyaev Lab; Adzhubei et al., 2010) auf mögliche Beeinträchtigungen der Proteinfunktion untersucht, PolyPhen-2 Scores >0.85, zwischen 0.85 und 0.15, und <0.15 wurden als „wahrscheinlich beeinträchtigend“, „möglicherweise beeinträchtigend“, und „benigne“ eingestuft. Für nicht kodierende Regionen wurde ein anderes Score-System benötigt, der „*FATHMM-Score*“ (Shihab et al., 2014). Scores von > 0,7 werden als pathogen, Scores von <0,5 als neutral bewertet.

3.10. Next Generation Sequencing (NGS)

Die Sequenzierung des Patienten-Kollektivs wurde in drei Fällen mittels der NGS im Rahmen der Routine-Analysen durchgeführt, daher wird dies hier nur kurz angesprochen. Die DNA wird wie für die Sequenzierung nach Sanger aufbereitet, jedoch werden beim NGS viele PCR- und Sequenzierungsreaktionen auf einmal durchgeführt. Mittels Essays wird ein ganzes Panel an klinisch relevanten Genen oder Mutationshotspots gleichzeitig amplifiziert und sequenziert. „Variant calling“ wird durchgeführt, um kleine Diskrepanzen im Alignment zu detektieren, diese können Mutationen repräsentieren. In der Routinediagnostik wurde bei den Fällen 28-30 das „TruSight Myeloid Sequencing Panel“ der Firma Illumina genutzt (Illumina, San Diego, USA). Es enthält Primer für ein Panel von 15 Genen, darunter auch Exon 3-11 des *TET2*-Gens sowie 39 weitere Onkogene Hotspots. Die Sequenzierung erfolgte mit dem MiSeq (Illumina). Als Software für die Auswertung wurde die JobPilot Software Suite genutzt (JSI medical systems, New York, USA).

4. Ergebnisse

4.1. Charakteristika des ausgewählten Patientenkollektivs

Es wurden insgesamt 55 Fälle aus der Datenbank des Instituts für Humangenetik, UKSH Kiel, nach den beschriebenen Kriterien ausgewählt (Kapitel 2.6 und 2.8). Anhand der Einschlusskriterien wurden zwei Gruppen gebildet. Die erste Gruppe umfasste 30 Patienten mit einem normalen Karyotyp im Alter von 18 bis 90 Jahren (Mittelwert = 64,1 Jahre, Standardabweichung = 15.6 Jahre), davon 12 Frauen und 18 Männer. Die zweite Gruppe umfasste 25 Patienten mit einem aberranten Karyotyp mit chromosomalen Veränderungen im Alter von 53 bis 86 Jahren (Mittelwert = 75.68 Jahre, Standardabweichung = 7 Jahre), davon 12 Frauen und 13 Männer.

4.2. Gruppe 1, Fälle mit einer myeloischen Neoplasie und normalem Karyotyp

Die folgende Tabelle enthält die in Gruppe 1 eingeschlossenen Fälle mit Angaben des Geschlechts, Alters und Karyotyps (Tabelle 23). Es wurde im November 2017 bei allen Verdachtsdiagnosen einer myeloischen Neoplasie eine endgültige Diagnose und ein Gesamtüberleben (OS in Monaten) abgefragt, sofern noch möglich.

Tabelle 23. Patienten "mit normalem Karyotyp". 30 Fälle ohne Veränderungen des Karyotyps aus der Routinediagnostik mit Angabe des Gesamtüberleben sofern erhebbar. OS = Overall Survival.

Nr.	Geschl.	Alter	Karyotyp	Endgültige Diagnose	OS
1	w	62	46,XX[23]	AML	35
2	w	72	46,XX[20]	Autoimmunhämolytische Anämie	3
3	m	74	46,XY[23]	Chron. Niereninsuffizienz	
4	m	39	46,XY[20]	CMV-Infektion nach NTX	*
5	w	47	46,XX[20]	Vaskulitis	*
6	m	77	46,XY[16]	MDS unklassifiziert	68
7	m	67	46,XY[18]	AML	*
8	w	75	46,XX[22]	Unbekannt	
9	m	48	46,XY[24]	MDS unklassifiziert	33
10	m	59	46,XY[20]	Unbekannt	
11	w	72	46,XX[20]	CLL	18
12	w	83	46,XX[17]	Unbekannt	
13	m	50	46,XY[20]	Postinfektiöse BB-Veränderung	*
14	m	59	46,XY[21]	Unbekannt	
15	m	72	46,XY[24]	Vaskulitis	*
16	w	60	46,XX[20]	Systemische Sklerose	*
17	w	85	46,XX[21]	MDS unklassifiziert	23
18	w	90	46,XX[17]	MDS unklassifiziert	57
19	m	61	46,XY[21]	Morbus Wegener	*
20	w	77	46,XX[28]	MDS unklassifiziert	
21	w	58	46,XX[19]	Monoklonale Gammopathie	*

22	m	76	46,XY[26]	MDS unklassifiziert	*
23	m	73	46,XY[20]	Unbekannt	
24	m	69	46,XY[25]	MDS unklassifiziert	26
25	m	60	46,XY[15]	Idiopathische Thrombozytopenie	*
26	m	18	46,XY[10]	MDS RCC	*
27	m	73	46,XY[21]	CMML	
28	w	73	46,XX[20]	CMML	
29	m	37	46,XY[20]	CMML	
30	m	57	46,XY[20]	Sekundäre AML	*

(*): Lebte zum Zeitpunkt der Datenerfassung (11/17) noch.

In der Tabelle ist ersichtlich, dass eine myeloische Erkrankung in nur 14 Fällen endgültig diagnostiziert wurde. In zwei Fällen (Fall 11 und 21) wurde eine lymphatische hämatologische Neoplasie diagnostiziert, in 5 Fällen könnte die endgültige Diagnose nicht eruiert werden und in 9 Fällen wurde eine hämatologische Systemerkrankung ausgeschlossen.

4.3. Gruppe 2, Fälle mit einer myeloischen Neoplasie und aberrantem Karyotyp

Die folgende Tabelle enthält die restlichen 25 der 55 eingeschlossenen Fälle mit einem aberranten Karyotyp mit Angaben des Geschlechts, Alters und Karyotyps (Tabelle 24). Auch hier wurde ebenso im November 2017 eine endgültige Diagnose und Gesamtüberleben abgefragt.

Tabelle 24. Patienten "mit aberrantem Karyotyp". 25 Fälle mit chromosomalen Veränderungen aus der Routinediagnostik mit Angabe des Gesamtüberlebens sofern erhebbbar. OS = Overall Survival.

Nr	Geschl.	Alter	Karyotyp	Endgültige Diagnose	OS
31	w	71	46,XX,del(5)(q14q34)[6]/46,XX[2]	Unbekannt	
32	m	73	46,XY,del(5)(q23q34)[4]/46,XY[21]	MDS unklassifiziert	38
33	m	77	45,X,-Y[28]	Unbekannt bei unklarer Panzytopenie	*
34	m	72	47,XY,+14[9]/47,XY,+8[5]/46,XY[7]	Unbekannt	
35	m	86	45,X,-Y[20]	Monoklonale Gammopathie	19
36	w	82	46,XX,del(5)(q14q34)[12]/46,XX[4]	MDS unklassifiziert	45
37	w	78	47,XX,+14[13]/46,XX[2]	CMML	17
38	w	76	46,XX,del(8)(q21q23)[17]/46,idem,+1,der (1;15)(q10;q10)[3].nuc ish 8q22 (RUNX1T1 x 2), 22q11 (RUNX1 x 2)	MDS unklassifiziert	56
39	w	69	47,XX,+8[9]/46,XX[3]	MDS RAEB-II	13
40	m	77	49,XY,+X,+11,+14[6]/46,XY[22]	MDS unklassifiziert	
41	w	67	44,XX,del(5)(q14q34),-7,-18[11]/46,XX[9]	MDS unklassifiziert	9
42	m	72	47,XY,+8[14]	MDS unklassifiziert	
43	m	86	46,XY,del(20)(q11q13)[18]/46,XY[2]	MDS unklassifiziert	69
44	w	69	46,XX,del(5)(q14q34)[10]/46,XX[11]	Unbekannt	
45	w	74	47,XX,+8[8]/46,XX[2]	MDS unklassifiziert	82

46	w	83	46,XX,del(5)(q14q34)[7]/45,idem,del(2)(p13),der(4)t(?2;4)(p22;q11),der(9)del(9)(p12)del(9)(q31),der(12;17)(q10;q10)[9]/46,XX[4]	MDS unklassifiziert	11
47	w	82	47,XX,+8[10]/46,X,?del(X)(q?13q?21)[5]/46,XX[5]	MDS RAEB-II	5
48	m	79	46,XY,del(20)(q12q13)[16]	MDS unklassifiziert	5
49	m	53	46,XY,del(20)(q12q13)[14]	MDS unklassifiziert	*
50	w	77	46,XX,r(11)(p14q13)[13].nuc ish 5 (D5S721/D5S23 x 2,EGR1 x 2), 11q23 (MLL prox x 1, MLL dist x 1)	MDS unklassifiziert	*
51	m	79	45,X,-Y[16]/46,XY[1]	Unbekannt	
52	m	75	45,XY,-17,-19,-22,+2r[7]/46,XY[3].nuc ish 17 (P53 x 1, MPO x 2)	MDS unklassifiziert	9
53	m	83	46,XY,del(5)(q14q34)[14]/46,XY[5]	MDS unklassifiziert	17
54	w	78	46,XX,del(11)(q22q25)[6]/46,XX[25].nuc ish 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2), 11q23 (MLL prox x 1, MLL dist x 1)	MDS unklassifiziert	21
55	m	74	46,XY,-5,r(6)(p25q16)dup(6)(p12p24),add(7)(q21),+mar[5]/46,idem,del(8)(q12)[19]/46,XY[5]	MDS RAEB-I	2

(*): Lebte zum Zeitpunkt der Datenerfassung (11/17) noch.

In 19 der 25 Fälle wurde die Diagnose einer myeloischen Erkrankung klinisch gesichert. In 5 Fällen könnten keine Angaben zur endgültigen Diagnose gewonnen werden und in einem Fall wurde eine monoklonale Gammopathie diagnostiziert. Das Spektrum der chromosomalen Aberrationen in diesen 6 Fällen überlappt sich mit den für die myeloischen Neoplasien charakteristischen Veränderungen, sodass aus zytogenetischer Sicht diese Fälle in Einklang mit der Diagnose einer myeloischen Erkrankung stehen.

4.4. Resultate des FISH-Screenings mit dem eingesetzten Sondenpanel

Die Sonden des Panels wurden dahingehend ausgewählt, um die rekurrenten Veränderungen bei myeloischen Neoplasien zu detektieren. Die bei den myeloischen Neoplasien häufigsten rekurrenten Veränderungen so wie deren klinische Bedeutung wurden in den Kapiteln 1.2.1 bis 1.2.4 angesprochen.

Die „5q31“-Sonde und *PDGFRB*-BAP Sonde wurden eingesetzt, da sie Deletionen in 5q detektieren und in Kombination eingrenzen können. Diese ist häufig beim MDS, außerdem als einzige zytogenetische Aberration für das MDS krankheitsdefinierend (Kapitel 1.2.2). Außerdem wurde eine Assoziation von 5q- und *TET2*-Mutationen vermutet (La Starza et al., 2012). Darüber hinaus erlaubt die *PDGFRB*-BAP Sonde die Detektion von Translokationen innerhalb des *PDGFRB*-Gens, wie z. B. die t(5;12)(q33;p13) mit Beteiligung der *PDGFRB*- und *ETV6*-Gene, diese wurden bei CMML Patienten beschrieben.

Ebenfalls hatte die Arbeitsgruppe (La Starza et al., 2012) eine Assoziation ebenfalls mit der Deletion 7q für wahrscheinlich erachtet. Daher ist die Sonde „7q-“ ausgewählt worden, auch für die CMML ist 7q- eine häufige Aberration. Die Monosomie 7 ist auch durch diese Sonde zu sehen und kommt häufig sowohl beim MDS als auch bei der CMML vor (Kapitel 1.2.2 und 1.2.3). Mutationen und Deletionen im Bereich von *TP53* sind für viele myeloische Neoplasien wichtig, *TP53* Mutationen treten gehäuft u.a. bei der AML und dem MDS auf (Kapitel 1.2.2. und 1.2.4.). Eine Assoziation zwischen *TET2* und *TP53* könnte naheliegend sein.

Für das MDS sind die zytogenetischen Aberrationen –Y, Trisomie 8 und del(20q) häufig und haben einen Stellenwert in der Diagnostik, sie kommen teils auch bei der CMML vor (Kapitel 1.2.2. und 1.2.3.). Die Abdeckung mittels der Sonden „X/Y/18“, „20q-“ und „t(8;21)“ war somit unverzichtbar. Ebenfalls dient die „t(8;21)“ Sonde zur Detektion der Translokation t(8;21)(q22;q22.1) mit Fusion der *RUNX1T1* auf 8q22 und *RUNX1* auf 21q22.1. Weiterhin sollen Trisomien des Chromosoms 21 mit der „t(8;21)“ nachgewiesen werden. Da die Signalkonstellation im Falle einer Trisomie 21 und einer Translokation mit Bruchereignis innerhalb des *RUNX1*-Gens (wo die Sonde hybridisiert) nicht zu unterscheiden wäre, wird eine weitere Sonde zur Detektion von numerischen Veränderungen von Chromosom 21 (*RCAN1*-Genort) „13q;21q“ angewandt. Ebenfalls können mit der „13q;21q“-Sonden Deletionen des Tumorsuppressorgens *RB1* auf 13q14 oder die Monosomie 13, sowie eine Trisomie 13 nachgewiesen werden.

In rund 10% aller AML-Fälle sind Translokationen des *MLL*-Genes mit mehr als 80 verschiedenen Partnern beschrieben (Winters et al., 2017), somit wurde die Sonde „11q23“ ausgewählt um mögliche *MLL*-Bruchereignisse darzustellen. Diese Sonde erlaubt auch die Detektion interstitieller und terminaler Deletionen des langen Arms von Chromosom 11, was in der Risikostratifizierung der MDS eine Rolle spielt (Greenberg et al., 2012).

Letztlich wurde eine Sonde zur Detektion von Veränderungen des *TET2*-Gens eingesetzt, da dies das Ziel dieser Doktorarbeit darstellt.

Es folgen die Ergebnisse der Fälle mit normalem Karyotyp (Gruppe 1) und dann die Fälle mit aberrantem Karyotyp (Gruppe 2). Es wurde das beschriebene Sondenpanel bei allen Fällen angewandt und je 100 Zellen je Fall und Sonde ausgezählt. Die Nachweisgrenze wurde festgesetzt auf 5%.

4.4.1. Ergebnisse des FISH-Screenings der Gruppe 1

Die Fälle der Gruppe 1, die einen normalen Karyotyp mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse aufwiesen, wurden mit dem ausgewählten Sondenpanel gescreent.

Diese Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 25 dargestellt. Die kompletten zytogenetischen und molekularzytogenetischen Ergebnisse aller 30 Fälle befinden sich in einer ausführlichen Tabelle im Anhang (Kapitel 10.1, Tabelle 37).

Erwartungsgemäß zeigten 25 der 30 Fälle keine Veränderungen in Bezug auf die eingesetzten Sonden. Interessanterweise wurde in zwei Fällen eine kryptische Deletion des *TET2*-Gens (Fall 22 und 30) aufgedeckt. Zwei weitere Fälle wiesen eine Deletion des Y-Chromosoms auf (Fall 6 und 10). Somit stehen die FISH-Ergebnisse in Einklang mit der klinischen Diagnose einer myeloischen Erkrankung.

Tabelle 25. Identifizierte kryptische chromosomale Veränderungen in der Gruppe 1. Während der vollständigen FISH-Untersuchung mittels des Sondenpanels aus Tabelle 2 von Fall 1-30 erhobenen auffälligen Befunde.

Fall	Geschlecht	Alter	Positive Befunde, [x/100 ausgewerteten Interphase-Kernen]
6	m	77	-Y [18]
10	m	59	-Y [33]
11	w	72	del(13)(q14q14) [18]
22	m	76	del(4)(q24q24) [92]
30	m	57	del(4)(q24q24) [55]

Kryptische Befunde für die Chromosomen-Bänderungsanalyse sind dick gedruckt. Die ausführlichen Ergebnisse finden sich im Anhang (10.1) in Tabelle 37.

Im Fall 11 wurde eine kryptische 13q-Deletion identifiziert. Diese Veränderung kommt bei myeloischen Erkrankung vor, allerdings sind am häufigsten 13q-Deletionen bei Patienten mit CLL zu finden. Die Recherchen nach der Abfrage der endgültigen klinischen Diagnose der in dieser Arbeit untersuchten Fälle ergaben, dass es sich bei diesem Fall nicht um eine myeloische Neoplasie handelte, sondern um eine CLL. Daher wurde dieser Fall aus allen weiteren Analysen und Berechnungen ausgeschlossen. Ebenfalls wurde der Fall 21 mit der Diagnose einer monoklonalen Gammopathie ausgeschlossen, da bei diesem Fall keine myeloischen-typischen chromosomale Aberrationen weder zytogenetisch noch mittels FISH detektiert wurden.

4.4.2. Ergebnisse des FISH-Screenings der Gruppe 2

Die Fälle der Gruppe 2, die einen aberranten Karyotyp mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse aufwiesen, wurden mit dem ausgewählten Sondenpanel und der FISH-Technik gescreent. Es konnten wie erwartet in 24 von 25 Fällen Veränderungen mit den eingesetzten Sonden bestätigt bzw. neu aufgedeckt werden (Tabelle 26). Die kompletten zytogenetischen und molekularzytogenetischen Ergebnisse aller Fälle befindet sich in einer ausführlichen Tabelle im Anhang (Kapitel 10.1, Tabelle 38).

Die in der Chromosomen-Bänderungsanalyse identifizierten und bereits beschriebenen Veränderungen, welche mit dem eingesetzten Sondenpanel zu detektieren waren, wurden alle bestätigt. Außerdem konnten auch in Gruppe 2 kryptische Veränderungen identifiziert werden, die für die Chromosomen-Bänderungsanalyse nicht sichtbar gewesen sind. Von 5 Fällen mit einer del(20q) mittels FISH waren zwei kryptisch für die Chromosomen-

Bänderungsanalyse (Fall 32 und 46). Eine Deletion des *TP53*-Gens war in 2 von 3 Fällen kryptisch (Fall 35 und 46) und eine Deletion des *TET2*-Gens (Fall 38) war ebenfalls kryptisch für die klassische Karyotypisierung. Ein Y-Verlust war nicht vorbeschrieben (Fall 32). Eine Monosomie 7 kam in zwei Fällen vor, wobei es in einem Fall (Fall 55) diesbezüglich eine Diskrepanz mit dem zytogenetischen Befund gibt, der wohl einer Veränderung in 7q aber keine Monosomie 7 beschreibt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass alle zytogenetisch gesicherten Aberrationen mittels FISH mit einem ausgewählten Sondenpanel nachvollzogen werden und neue kryptische Veränderungen in 4q24, 17p13 und 20q sowie einen Y-Verlust aufgedeckt werden konnten.

Tabelle 26. Identifizierte kryptische und zu erwartenden chromosomalen Veränderungen der Gruppe 2. Während der vollständigen Untersuchung mittels des Sondenpanels aus Tabelle 2 von Fall 31-55 erhobenen auffälligen Befunde.

Fall	Geschlecht	Alter	Positive Befunde, [x/100 ausgewerteten Interphase-Kernen]
31	w	71	del(5q) [30]
32	m	73	-Y [16] , del(5q) [10], del(20q) [10]
33	m	77	-Y [89]
34	m	72	+8 [15]
35	m	86	-Y [90], del(17p13) [15]
36	w	82	del(5q) [53]
38	w	76	del(4q24) [12]
39	w	69	+8 [84]
40	m	77	+X [12], +11 [26]
41	w	67	del(5q) [27], -7 [19], -18 [14]
42	m	72	+8 [71]
43	m	86	del(20q) [39]
44	w	69	del(5q) [45]
45	w	74	+8 [51]
46	w	83	del(5q) [51], del(17p13) [64] , del(20q) [23]
47	w	82	+8 [23], teils Tetraploid
48	m	79	del(20q) [81]
49	m	53	del(20q) [82]
50	w	77	del(11q23) [82]
51	m	79	-Y [55]
52	m	75	del(17p13) [7]
53	m	83	del(5q) [81]
54	w	78	del(11q23) [9]
55	m	74	dup(5p) [36], del(5q) [44], -7 [31]

Kryptische Befunde für die Chromosomen-Bänderungsanalyse sind dick gedruckt. Die ausführlichen Ergebnisse finden sich im Anhang (10.1) in Tabelle 38.

4.5. Mutationsstatus des *TET2*-Gens in drei Fällen mit einer *TET2*-Deletion

Im Kapitel 1.3.4 wurde auf die Funktion des *TET2*-Gens als Tumorsuppressorgen eingegangen und auf die Konsequenzen einer dosisabhängigen Tumorsuppressorfunktion, bei der das Ausschalten eines Allels für Effekte ausreichend ist und der vollständige Verlust der *TET2*-Funktion als Verstärkung des Effekts dient (Ko et al., 2011; Li et al., 2011; Moran-Crusio et al., 2011; Quivoron et al., 2011).

In der FISH wurden drei Fälle mit *TET2*-Deletionen entdeckt, Fall 22 und 30 aus der Gruppe 1 mit normalem Karyotyp und Fall 38 aus der Gruppe 2 mit aberrantem Karyotyp. Insgesamt handelt es sich um drei von 53 Fällen (5,7%), aus dem ursprünglichen Kollektiv von 55 Fällen, da eine CLL und eine monoklonale Gammopathie ausgeschlossen worden sind. Da Deletionen des *TET2*-Gens mit einem erhöhten Aufkommen von Mutationen des verbliebenen Allels nach *TET2*-Deletionen assoziiert zu sein scheinen (siehe Kapitel 1.3.9. und La Starza et al., 2012; Bacher et al., 2012), wurden diese drei Fälle mit einer *TET2*-Deletion ausgewählt, zwei Fälle (Fall 22 und Fall 38) davon mit dem in Kapitel 3.5. aufgeführten Primerpanel mittels der Sanger-Sequenzierung sequenziert. Ein Fall (Fall 30) wurde in der Routinediagnostik mittels NGS sequenziert.

Die Sanger-Sequenzierung hat eine Limitierung bezüglich der Länge der Fragmente, die ersten Basen sind schlecht zu beurteilen, ebenso lässt die Qualität nach einigen Hundert Basenpaaren deutlich nach. Das *TET2*-Gen ist über 10.000 Basenpaaren groß, insbesondere Exon 3 und 11 sind sehr lang. Für eine qualitativ hochwertige und vollständige Abdeckung des *TET2*-Gens mittels der Sanger-Sequenzierung wurde eine Fragmentierung der gesamten Sequenz von *TET2* in mehreren Teilsequenzen von einer adäquaten Länge von 180 bis 500 Basenpaare benötigt. Daher erfolgte in dieser Arbeit die Amplifikation mittels 21 Primerpaaren (siehe Kapitel 3.5). Die mittels Sanger-Sequenzierung untersuchten Fälle haben eine Angabe zur „VAF“ (*Variant Allel Frequency*). Diese „VAF“ gibt den Prozentsatz der gefundenen Veränderung in Bezug zum Wildtyp an. Allerdings kann die VAF bei der Sanger-Sequenzierung über die Fläche unter der Kurve des Elektropherogramms nur abgeschätzt werden. Mittels NGS konnte die VAF im Fall 30 genau, basierend auf der Anzahl der „Reads“, bestimmt werden. Beim NGS wird eine zufällige Mischung der DNA erzielt, daher entspricht die so erhobene VAF der Probe ungefähr auch der Allelfrequenz des Probanden.

In allen drei Fällen wurden Mutationen im *TET2*-Gen detektiert. Bei zwei Fällen traten jeweils zwei und drei *TET2*-Mutationen gleichzeitig auf (Fall 22 und 38). Beim Fall 30 trat eine einzige *TET2*-Mutation in der intronic Region des Exon 3 auf. Die Mutationen kamen sonst dreimal in Exon 3 und zweimal in Exon 11 vor. Im Folgenden wird auf die einzelnen Fälle eingegangen.

4.5.1. Sequenzvarianten im Fall 22

Die Sanger-Sequenzierung wurde an DNA des Falls 22 durchgeführt. Dabei handelte es sich um einen 76-Jahre alten männlichen Patienten der Gruppe 1 mit normalem Karyotyp mit einem klinisch diagnostizierten MDS (Tabellen 23 und 25). Die Amplifikation und Sequenzierung wurde erfolgreich an allen mit den 21 Primerpaaren abgedeckten DNA-Abschnitten durchgeführt. Es wurden zwei Mutationen in der kodieren Region des *TET2*-Gens nachgewiesen (Tabelle 27).

Tabelle 27. *TET2*-Mutationen im Fall 22. Nomenklatur inklusive Veränderung auf Proteinlevel, Lokalisation in Bezug auf das *TET2*-Gen, Art der Mutation und Anteil der Veränderung von der Gesamtmenge des analysierten Materials.

Nr.	Nomenklatur der Mutation	Exon	Typ	Auswirkung	VAF	SNP	PolyPhen-2 score
1	NM_001127208 (<i>TET2</i>): c.2746_2747insTp.(Gln916Leufs*8)	Exon 3	Insertion	Frameshift	50%	Nein	0.89
2	NM_001127208 (<i>TET2</i>): c.5161T>G p.(Leu1721Val)	Exon 11	Substitution	Missense	100%	(Ja*)	0.101

*An gleicher Position ist ein verbreiteter Austausch einer anderen Aminosäure zu finden, nach PolyPhen-2 Score handelt es sich um eine benigne Veränderung

Bei Veränderung Nummer 1 handelt es sich um eine Insertion von Thymin zwischen Base 2.746 und 2.747 der kodierenden Sequenz des Exons 3, daraus resultiert eine Veränderung der Aminosäuren-Sequenz für 8 Positionen bevor ein Stopcodon entsteht. Diese Veränderung kam schätzungsweise in 50% der analysierten Zellen vor. Nach dem PolyPhen-2 Score (Score 0.89) wird diese Veränderung als wahrscheinlich beeinträchtigend bzw. pathogen eingestuft (Kapitel 3.9).

Bei Veränderung 2 handelt es sich um eine Substitution von Thymin zu Guanin an Stelle 5.161 der kodierenden Sequenz des Exons 11, welche den Austausch der Aminosäure Leucin in Valin zur Folge hat. Der PolyPhen-2 Score ergibt 0.101, damit wird diese Veränderung als benigne eingestuft. Es gibt an der gleichen Position laut „ExAC“ und dem „NCBI 1000 Genome Browser“ sowie „ClinVAR“ eine verbreitete Veränderung mit Austausch einer anderen Aminosäure unter der Referenznummer „rs34402524“, daher ist Veränderung 2 am ehesten eine bislang nicht beschriebene SNP.

4.5.2. Sequenzvarianten im Fall 30

Der Fall 30 wurde in der vorliegenden Arbeit nach einer gezielten Suche nach Fällen mit einer myeloischen Neoplasie und *TET2*-Mutationsstatus mittels NGS aus dem Archiv des Instituts für Humangenetik, UKSH Kiel, eingeschlossen (siehe Kapitel 2.6). Es handelte sich um einen 57-Jahre alten männlichen Patienten der Gruppe 1 mit normalem Karyotyp mit einer klinisch diagnostizierten CMML, diese war in eine AML transformiert (Tabellen 23 und

25). Es wurde eine Mutation in der intronischen Region des *TET2*-Gens nachgewiesen (Tabelle 28).

Tabelle 28. *TET2*-Mutation im Fall 30. Nomenklatur inklusive Veränderung auf Proteinlevel, Lokalisation in Bezug auf das *TET2*-Gen, Art der Mutation, und Anteil der Veränderung von der Gesamtmenge des analysierten Materials.

Nr.	Nomenklatur der Mutation	Exon	Typ	Auswirkung	VAF	SNP	FATHMM prediction
1	NM_001127208.2 (<i>TET2</i>): c.3409+2T>G	Intron nach Exon 3	Substitution	<i>Splicesite</i>	100%	Nein	0.96

Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine Substitution von Thymin zu Guanin, der 2. Base im Intron direkt nach Exon 3. Es kommt zu einem fehlerhaften Splicevorgang. Diese Mutation ist bereits in „Cosmic“ beschrieben (ID: COSM4170050). Bei einer derartigen Mutation wurde zur Ergänzung der „*FATHMM-Prediction Score*“ genutzt, da der PolyPhen-2 Score dafür nicht geeignet ist. Die *FATHMM prediction* ergibt einen Score von 0.96 (pathogen).

4.5.3. Sequenzvarianten im Fall 38

Die Amplifikation und Sanger-Sequenzierung mit allen 21 Primerpaaren wurde an DNA des Falls 38 erfolgreich durchgeführt. Dabei handelte es sich um eine 76-Jahre alte weibliche Patientin mit einem klinisch diagnostizierten MDS (Tabellen 24 und 26). Diese Patientin zeigte einen aberranten Karyotyp in der Chromosomen-Bänderungsanalyse mit einer 8q-Deletion und einem subklonalen 1q-Zugewinn aufgrund einer unbalancierten Translokation der(1;15)(q10;q10) und wurde somit zu der Gruppe 2 mit aberrantem Karyotyp eingeteilt. Bemerkenswert ist, dass keine dieser Aberrationen zu den charakteristischen Abnormalitäten der myeloischen Neoplasien gehört. Es wurden drei Mutationen in der kodierenden Region des *TET2*-Gens nachgewiesen (Tabelle 29).

Tabelle 29. *TET2*-Mutationen im Fall 38. Nomenklatur inklusive Veränderung auf Proteinlevel, Lokalisation in Bezug auf das *TET2*-Gen, Art der Mutation und Anteil der Veränderung von der Gesamtmenge des analysierten Materials.

Nr.	Nomenklatur der Mutation	Exon	Typ	Auswirkung	VAF	SNP	PolyPhen-2 score
1	NM_001127208.2 (<i>TET2</i>): c.1726G>T p.(Glu576*)	Exon 3	Substitution	Nonsense	50%	Nein	Truncating
2	NM_001127208.2 (<i>TET2</i>): c.2474del p.(Ser825*)	Exon 3	Deletion	<i>Frameshift</i>	50%	Nein	Truncating
3	NM_001127208.2 (<i>TET2</i>): c.5284A>G p.(Ile1762Val)	Exon 11	Substitution	Missense	100%	Ja	0.012

Bei Veränderung 1 handelt es sich um eine Substitution von Guanin zu Thymin am Nukleotid 1.726 der kodierenden Sequenz des Exons 3. An dieser Stelle entsteht dadurch ein

Stopcodon (*Truncating* nach PolyPhen-2 Score) und somit handelt es sich um eine pathogene Mutation. Diese Veränderung kommt schätzungsweise in 50% der analysierten Zellen vor.

Der zweite Nukleotidaustausch führt zur Deletion einer Base an Stelle 2.474 der kodierenden Sequenz des Exons 3, welche einen *Frameshift* verursacht. Dieser führt zur Bildung eines Stopcodons an dieser Position (*Truncating* nach PolyPhen-2 Score). Sie ist ebenfalls in circa 50% der analysierten Zellen zu finden und als pathogen einzustufen.

Die dritte Mutation ist eine Substitution von Adenin durch Guanin am Nukleotid 5.284 der kodierenden Sequenz in Exon 11. An dieser Stelle kommt es zum Austausch einer Aminosäure. Der PolyPhen-2 Score ergibt 0.012 (benigne). Es handelt sich um ein bekannte SNP, mit der Referenznummer „rs2454206“ nach dem „NCBI 1000 Genome Browser“.

4.6. Mutationsstatus des *TET2*-Gens in vier Fällen ohne eine *TET2*-Deletion

Die Fälle 26 und 27 wurden, wie der Fall 30 aus Kapitel 3.13, nach einer gezielten Suche und Bestimmung des *TET2*-Mutationsstatus mittels Sanger-Sequenzierung, die Fälle 28 und 29 mittels NGS, eingeschlossen (siehe Kapitel 2.6). Die Fälle wurden ebenfalls im Rahmen der Routinediagnostik zytogenetisch und molekularzytogenetisch mittels Chromosomen-Bänderungsanalysen und FISH analysiert. Die Untersuchung nach *TET2*-Deletionen mittels FISH gehört nicht zu den Standardanalysen einer Routinediagnostik bei Verdacht auf eine myeloische Neoplasie, daher wurde der *TET2*-Kopiestatus im Rahmen dieser Doktorarbeit mittels FISH bestimmt.

Es wurden in den Fällen 26 und 29 je eine Mutation, in den Fällen 27 und 28 je zwei Mutationen detektiert. Es befanden sich drei Mutationen in Exon 3, zwei in Exon 11 und eine in Exon 6. Im Folgenden werden die Ergebnisse der anderen vier Fälle näher erläutert.

4.6.1. Sequenzvarianten im Fall 26

Der Mutationsstatus des *TET2*-Gens wurde mittels Sanger-Sequenzierung an DNA von Fall 26 ermittelt. Dabei handelte es sich um einen 18-Jahre alten männlichen Patienten mit einer klinisch diagnostizierten CMML der Gruppe 1 mit unauffälligem Karyotyp. Es wurde eine Mutation im *TET2*-Gen nachgewiesen (Tabelle 30).

Tabelle 30. *TET2*-Mutation im Fall 26. Nomenklatur inklusive Veränderung auf Proteinlevel, Lokalisation in Bezug auf das *TET2*-Gen, Art der Mutation, und Anteil der Veränderung von der Gesamtmenge des analysierten Materials.

Nr.	Nomenklatur der Mutation	Exon	Typ	Auswirkung	VAF	SNP	PolyPhen-2 score
1	NM_001127208.2 (<i>TET2</i>): c.86C>G p.(Pro29Arg)	Exon 3	Substitution	Missense	50%	Ja	0.868

Es handelt sich hierbei um eine Substitution von Cytosin zu Guanin an Position 86 der kodierenden Sequenz des Exons 3. Diese hat den Austausch der Aminosäure Prolin zu Arginin zur Folge und ist somit eine Missensemutation. Es handelt sich nach SNP-Datenbank (NCBI) unter der Referenznummer „rs12498609“ um eine bekannte SNP (Kapitel 5.2.4.). Der PolyPhen-2 Score ergibt jedoch 0.868 und ist damit pathologisch.

4.6.2. Sequenzvarianten im Fall 27

Der Mutationsstatus des *TET2*-Gens wurde mittels Sanger-Sequenzierung an DNA von Fall 27 ermittelt. Beim Fall 27 handelte es sich um einen 73-Jahre alten männlichen Patienten mit einer klinisch diagnostizierten CMML der Gruppe 1 mit unauffälligem Karyotyp. Mittels NGS wurden an DNA zwei Mutationen in *TET2* nachgewiesen (Tabelle 31).

Tabelle 31. *TET2*-Mutation im Fall 27. Nomenklatur inklusive Veränderung auf Proteinlevel, Lokalisation in Bezug auf das *TET2*-Gen, Art der Mutation und Anteil der Veränderung von der Gesamtmenge des analysierten Materials.

Nr.	Nomenklatur der Mutation	Exon	Typ	Auswirkung	VAF	SNP	PolyPhen-2 score
1	NM_001127208 (<i>TET2</i>): c.2525C>G p.(S842*)	Exon 3	Substitution	Nonsense	50%	Nein	Truncating
2	NM_001127208 (<i>TET2</i>): c.3737C>A p.(S1246*)	Exon 6	Substitution	Nonsense	50%	Nein	Truncating

Bei erstem Nukleotidaustausch handelt es sich um eine Substitution von Cytosin zu Guanin an Position 2.525 der kodierenden Sequenz des Exons 3, welche zur Bildung eines Stopcodons führt. Die Mutation ist in „Cosmic“ beschrieben (ID: COSM5878980). Laut PolyPhen-2 Score ist dies pathologisch einzustufen (*Truncating* nach PolyPhen-2 Score).

Bei der Veränderung 2 ist eine Substitution von Cytosin zu Adenin an Position 3.737 der kodierenden Sequenz des Exons 6, welche ebenfalls zur Bildung eines Stopcodons führt. Laut PolyPhen-2 Score ist dies ebenfalls pathologisch einzustufen (*Truncating* nach PolyPhen-2 Score).

4.6.3. Sequenzvarianten im Fall 28

Der Mutationsstatus des *TET2*-Gens wurde mittels NGS an DNA von Fall 28 ermittelt. Dabei handelte es sich um eine 73-Jahre alte weibliche Patientin mit einer klinisch diagnostizierten CMML der Gruppe 1 mit unauffälligem Karyotyp. Mittels NGS wurden zwei Mutationen in *TET2* nachgewiesen (Tabelle 32).

Tabelle 32. *TET2*-Mutation im Fall 28. Nomenklatur inklusive Veränderung auf Proteinlevel, Lokalisation in Bezug auf das *TET2*-Gen, Art der Mutation, und Anteil der Veränderung von der Gesamtmenge des analysierten Materials.

Nr.	Nomenklatur der Mutation	Exon	Typ	Auswirkung	VAF	SNP	PolyPhen-2 score
1	NM_001127208 (<i>TET2</i>): c.685_686insA p.Thr229Asnfs*25	Exon 3	Insertion	<i>Frameshift</i>	33%	Nein	1
2	NM_001127208 (<i>TET2</i>): c.4954C>T p.Gln1652*	Exon 11	Substitution	Nonsense	38%	Nein	Truncating

Der erste Nukleotidaustausch ist eine Insertion von Adenin zwischen Stelle 685 und 686 der kodierenden Sequenz des Exons 3, daraus resultiert eine Veränderung der Aminosäure-Sequenz für 25 Positionen bevor ein Stopcodon entsteht. Laut PolyPhen-2 Score ist dies als pathologisch einzustufen (PolyPhen-2 Score von 1). Die Mutation ist in „Cosmic“ beschrieben (ID: COSM5020249).

Veränderung 2 ist eine Substitution von Cytosin zu Thymin an Position 4954 der kodierenden Sequenz des Exons 11, welche zur Bildung eines Stopcodons führt. Laut PolyPhen-2 Score ist dies als pathologisch einzustufen (*Truncating* nach PolyPhen-2 Score). Diese Mutation ist ebenfalls in „Cosmic“ beschrieben (ID: COSM4170053).

4.6.4. Sequenzvarianten im Fall 29

Der Mutationsstatus des *TET2*-Gens wurde mittels NGS an DNA von Fall 29 ermittelt. Dabei handelte es sich um einen 37-Jahre alten männlichen Patienten mit einer klinisch diagnostizierten CMML aus Gruppe 1 mit unauffälligem Karyotyp. Mittels NGS wurde eine Mutation in *TET2* nachgewiesen (Tabelle 33).

Tabelle 33. *TET2*-Mutation im Fall 29. Nomenklatur inklusive Veränderung auf Proteinlevel, Lokalisation in Bezug auf das *TET2*-Gen, Art der Mutation, und Anteil der Veränderung von der Gesamtmenge des analysierten Materials.

Nr.	Nomenklatur der Mutation	Exon	Typ	Auswirkung	VAF	SNP	PolyPhen-2 score
1	NM_001127208.2 (<i>TET2</i>): c.5103G>A p.Met1701Ile	Exon 11	Substitution	Missense	50%	Ja	0.01

Es handelt sich hier um eine Substitution von Guanin zu Adenin an Position 86 der kodierenden Sequenz des Exons 3. Diese hat den Austausch der Aminosäure Methionin zu Isoleucin zur Folge und ist somit eine Missensemutation. Laut PolyPhen-2 Score ist dies als benigne einzustufen (PolyPhen-2 Score von 1). Es ist eine bekannte SNP mit der Referenznummer „rs62623390“.

4.6.5. Allelstatus des *TET2*-Lokus bei Fällen des eigenen Kollektivs (LOH von *TET2*)

Insgesamt wurden 7 Fälle von 53 mit einer *TET2*-Variantsequenz gefunden, von denen drei Fällen zugleich eine *TET2*-Deletion (hemizygote Mutationen) aufwiesen. Somit liegt in diesen drei Fällen eine sichere LOH in Bezug auf das *TET2*-Gen vor. In Kapitel 1.3.9 wurde auf die LOH und UPD ausführlich eingegangen. In allen drei Fällen von *TET2*-LOH (Fall 22, 30 und 38) zeigten sich Variantensequenzen, die als SNPs eingeordnet wurden, jedoch mindestens eine weitere pathologische Mutation konnte in jedem Fall identifiziert werden.

Die Fälle 26-29 mit einer *TET2*-Mutation zeigten dagegen keine gleichzeitige *TET2*-Deletion. In den Fällen 27 und 28 wurden zwei pathologische Mutationen in *TET2* detektiert. Daher ist es hochwahrscheinlich, dass es zu einer LOH von *TET2* durch die Inaktivierung des *TET2*-Gens aufgrund biallelischer Mutationen kam. Obwohl diese Mutationen in beiden Fällen in verschiedenen Exonen auftreten, kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass beide auf demselben Allel vorkommen. In dieser Konstellation würden diese Fälle keine *TET2*-LOH aufweisen. Im Folgenden wird jedoch angenommen, dass es sich um biallelische Mutationen handelt, wenn gleichzeitig zwei *TET2*-Mutationen auftreten.

In den Fällen 26 und 29 wurde nur eine einzige Variantsequenz für *TET2* identifiziert. Da das andere *TET2*-Allel nicht deletiert gewesen ist, liegt hier in beiden Fällen, anders als in den fünf vorherigen Fällen, keine *TET2*-LOH vor. Außerdem wurden diese zwei Variantensequenzen als SNP eingestuft, somit liegen in den beiden Fällen zwei intakten Kopien des *TET2*-Gens vor.

Zusammengefasst wurden in der vorliegenden Arbeit drei Fälle mit einer gesicherten *TET2*-LOH (3 von 53 Fälle, 6%) und zwei Fällen mit einer hochwahrscheinlichen *TET2*-LOH (2 von 53 Fälle, 4%) identifiziert. Um diesem Zusammenhang weiter nachzugehen wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, um größere Gruppen von Fällen mit *TET2*-Mutationen in Bezug auf LOH von *TET2* zu vergleichen.

4.7. Inzidenz von *TET2*-Deletionen und *TET2*-Mutationen im Kollektiv der Literatur

In dem vorangegangenen experimentellen Teil der Arbeit haben alle identifizierten pathologischen *TET2*-Mutationen zu einer *TET2*-LOH geführt, entweder durch hemizygote Mutationen oder durch mutmaßliche biallelische Mutationen (Kapitel 4.7). *TET2*-Deletionen sind seltene Ereignisse bei myeloischen Neoplasien (siehe Kapitel 1.3.9) daher wäre die Untersuchung eines größeren Kollektivs notwendig, um diese Beobachtung zu bestätigen oder auszuschließen. Da im Kollektiv aus dem Institut für Humangenetik, UKSH Kiel, keine weiteren Fälle identifiziert worden sind, wurde eine Literaturrecherche nach *TET2*-Veränderungen durchgeführt. Die Literaturrecherche hatte das Ziel Fälle mit gesicherten

TET2-LOH durch hemizygote oder homozygote Mutationen in Bezug auf das *TET2*-Gen mit Fällen ohne *TET2*-LOH zu vergleichen.

Zuerst wurde die Inzidenz von *TET2*-Deletionen und *TET2*-Mutationen analysiert. Es wurden insgesamt die Daten von 151 Fällen mit *TET2*-Deletionen und/oder Mutationen aus 2.821 Fällen mit myeloischen Neoplasien (AML, CMML, MDS, MDS/MPN und MPN) aus 12 Publikationen erhoben (Abáigar et al., 2016; Bacher et al., 2012; Delhommeau et al., 2009; Hemmat et al., 2014; Jankowska et al., 2009; Kohlmann et al., 2010; Kosmider et al., 2009; La Starza et al., 2012; Lin et al., 2014; Manchev et al., 2017; Nibourel et al., 2010; Ortmann et al., 2015). Die Parameter der Literaturrecherchen sind in den Kapitel 2.8 und 2.8.1 zusammengefasst. Die umfangreiche Tabelle der 151 Fällen mit allen wichtigen Daten hinsichtlich des *TET2*-Gens befindet sich in Tabelle 39 Anhang 10.3.

Eine Chromosomen-Bänderung-, FISH- und SNP-Array-Analyse wurde in je 114, 31 und 65 der Fälle durchgeführt. Die Chromosomen-Bänderungsanalyse stellte *TET2*-Deletionen in 6 Fällen (zwei Fälle ebenfalls mittels FISH und ein Fall mittels SNP-Array analysiert und bestätigt), die FISH-Technik in 31 Fälle und die SNP-Array in 9 Fällen fest. Somit wurden insgesamt 43 Fälle von 2.821 (1,5%) mit einer *TET2*-Deletion nachgewiesen.

Bei 105 von 114 Fällen lag das vollständige Karyogramm vor, in nur 6 von 43 Fällen mit *TET2*-Deletionen konnte diese zytogenetisch detektiert werden. Somit waren die *TET2*-Deletionen in 86% der Fälle kryptisch für die Chromosomen-Bänderungsanalyse. Der *TET2*-Lokus-Status hinsichtlich Deletionen war in 52 Fällen unbekannt. Obwohl bei 24 dieser Fälle eine Chromosomen-Bänderungsanalyse vorlag, kann man aufgrund der höheren Anzahl von kryptischen *TET2*-Deletionen ohne weitere spezifische Untersuchungen, z. B. FISH, SNP-Array oder NGS, keine Aussage treffen.

Hinsichtlich der *TET2*-Mutationen wurden 187 unterschiedlichen Sequenzvarianten im *TET2*-Gen in den 151 Fällen abgezählt. In 14 Fällen mit unbekanntem *TET2*-Lokus-Status hinsichtlich Deletionen wurden zwei oder mehrere gleichzeitige pathogene *TET2*-Mutationen beschrieben. In weiteren 12 Fällen wurden ebenfalls gleichzeitige pathogene *TET2*-Mutationen beschrieben, jedoch wurde mittels SNP-Array keine numerische Imbalance von *TET2* gesehen. In 7 Fällen erwiesen sich die *TET2*-Varianten als benigne oder SNPs nach PolyPhen-2 score. Vier dieser SNPs traten als einzige Sequenzvarianten in *TET2* auf (Fälle 72 und 74 ohne *TET2*-Deletion, Fälle 21 und 121 mit unbekanntem *TET2*-Status, Tabelle 39, Anhang 10.3), zwei SNPs traten in Fällen mit einer weiteren pathogenen *TET2*-Mutation (Fall 143 ohne *TET2*-Deletion und Fall 120 unbekannt, Tabelle 39, Anhang 10.3) auf. Interessant ist der Fall 123 (Tabelle 39, Anhang 10.3) mit einem *TET2*-SNP, einer *TET2*-Deletion und keiner *TET2*-Mutation. Die Fälle 21, 72, 74, 121 wurden dementsprechend in den weiteren Berechnungen außer Acht gelassen.

Mittels der SNP-Array wurde in 8 der Fälle eine UPD für *TET2* nachgewiesen. UPD sind nur mittels spezifischer Techniken wie SNP-Array und ggf. NGS-Verfahren nachzuweisen. In dieser Doktorarbeit konnte eine UPD bei den eigenen Fällen mit den angewandten Techniken nicht eruiert werden, daher wurden diese 8 publizierten Fälle (Fälle 55 bis 62, Tabelle 39, Anhang 9.3) der Vergleichbarkeit halber nicht in die weiteren Auswertungen mit eingeschlossen. Unter Berücksichtigung, dass die Daten von 8 Fälle mit einer UPD und die Daten von 4 Fälle mit nur benignen SNPs ausgeschlossen wurden, bleiben insgesamt 172 pathogene *TET2*-Mutationen aus 139 Fällen.

Zusammenfassend fanden sich *TET2*-Mutationen in 5% der 2.821 Fällen mit einer myeloischen Neoplasie. Für die *TET2*-Deletionen betrug die Inzidenz im gesamten Kollektiv 1,5% und in den Fällen mit gleichzeitigen pathogenen *TET2*-Mutationen 31%. Für weitere Schlüsse bezüglich der Lokalisation oder Art der Mutation wurden in den folgenden Kapiteln weitere Zusammenhänge gesucht.

4.7.1. Allelstatus des *TET2*-Lokus bei Fällen der Literaturrecherche (LOH von *TET2*)

Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Literaturdaten enthalten ein Kollektiv von 42 Fällen, welche mit höherer Sicherheit kein funktionierendes Allel von *TET2* bzw. ein *TET2*-LOH aufweisen (Tabelle 33). Wie die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Fälle 22, 30 und 38, zeigen diese Fälle eine *TET2*-Deletion (mittels Chromosomen-Bänderung in 6, FISH in 28 und SNP-Array in 8 Fällen) begleitet von *TET2*-Mutationen (Tabelle 33). Interessanterweise weisen fünf Fälle eine *TET2*-Deletion und mehrere *TET2*-Mutationen auf. Somit können bei Fällen mit einem nachgewiesenen Verlust des *TET2*-Allels bis zu drei Mutationen gleichzeitig auftreten.

Tabelle 33. Allelstatus. Die Tabelle zeigt die Verteilung der *TET2*-Mutationen und einer *TET2*-LOH in Bezug zu den durchgeführten Untersuchungen

	Anzahl der Fälle ohne <i>TET2</i> -Mutation	Anzahl der Fälle mit 1 <i>TET2</i> -Mutation	Anzahl der Fälle mit ≥ 2 <i>TET2</i> -Mutation	<i>TET2</i> -LOH
<i>TET2</i> -Deletion mittels Chromosomen-Bänderung	0	6	0	6
<i>TET2</i> -Deletion mittels FISH	1	24*	4*	28
<i>TET2</i> -Deletion mittels SNP-Array	0	7	1	8
Keine <i>TET2</i> -Deletion mittels SNP-Array	0	34	12	12**
Unbekannte <i>TET2</i> -Status hinsichtlich Deletion	0	36	14	14**

*6 Fälle mittels der Bänderungsanalyse wurden in 2 Fälle mittels FISH und 1 Fall mittels SNP-Array bestätigt. Diese Fälle wurden bei FISH und SNP-Array abgezogen. **Mutmaßliche homozygote Mutationen (siehe Kapitel 4.6.5).

Außerdem wurde in der Literaturrecherche eine Gruppe von 26 Patienten gesehen, die mindestens zwei und höchstens vier *TET2*-Mutationen aufweisen, davon zeigten 12 Fällen mittels SNP-Array keine *TET2*-Deletion (Tabelle 33). Dieses Mutationsmuster wurde ebenfalls in den Fällen 27 und 28 des eigenen Kollektivs identifiziert. Somit wird hier auch von einem *TET2*-LOH aufgrund biallelischer *TET2*-Mutationen ausgegangen.

Die hier durchgeführten Analysen zeigten eine Inzidenz von 30% für hemizygot (42 von 139 Fällen) und von 19% für homozygot *TET2*-Mutationen (26 von 139 Fällen) unter den publizierten Daten. Die Fälle der Literaturdaten zusammengekommen ergeben eine Inzidenz von ca. 50% für *TET2*-LOH. Zählt man die 36 Fälle mit einem hinsichtlich Deletionen betreffend unbekannten *TET2*-Status nicht mit dazu, steigt die Inzidenz auf 66% (68 von 103 Fällen), davon 41% für hemizygot *TET2*-Mutationen und 25% für homozygot *TET2*-Mutationen.

4.8. Korrelation der *TET2*-LOH Inzidenz zwischen den eigenen Fällen und den Literaturdaten

Alle in dieser Doktorarbeit gesicherten Befunde und die Daten hinsichtlich des *TET2*-LOH Status aus der Literaturrecherche wurden verglichen und auf mögliche Zusammenhänge hin untersucht. Da *TET2* eine Tumorsuppressorfunktion zugeschrieben wird (Kapitel 1.3.4) und durch den totalen Verlust der *TET2*-Aktivität durch Mutationen und/oder Deletionen oder beides gleichzeitig eine Relevanz vermutet wird, werden die Mutationen der Fälle mit LOH für *TET2* mit Mutationen der Fälle, welche heterozygot für *TET2* sind, verglichen (Tabellen 34 und Abbildung 6).

In Beobachtungen aus den eigenen Fällen war die Anzahl der pathologischen Mutationen in den publizierten Fällen mit einer *TET2*-LOH (hemizygot Mutation bei gesicherter Deletion) höher als in den Fällen ohne *TET2*-LOH (heterozygot Mutationen ohne gleichzeitige Deletion) (Kapitel 4.5). Daher erfolgten in gleicher Gegenüberstellung in einer weiteren Tabelle die Mutationen pro Fall (Tabelle 34).

Tabelle 34. Ratio der Mutationen pro Fall (Literaturdaten und eigene Fälle). Fälle und *TET2*-Mutationen der beiden Gruppen der Literaturrecherche und der eigenen Fälle zur Bildung einer Ratio.

Gruppe <i>TET2</i> -LOH *	Anzahl Eigene/Literatur Fälle	Gruppe <i>TET2</i> -Heterozygot**	Anzahl Eigene/Literatur Fälle
Identifizierte Fälle	5/68	Identifizierte Fälle	0/35***
Pathologische Mutationen	8/102	Pathologische Mutationen	0/34***
Mutationen pro Fall	1,51	Mutationen pro Fall	0,97

*: durch hemizygot oder homozygot Mutationen (UPD ausgeschlossen). **: durch Mutation oder Deletion. ***: Eigene Fälle 26 und 29 mit je nur eine SNP und 26 Fälle aus der Literatur mit einem unbekannten *TET2*-Status.

Die Ratio der Mutationen pro Fall stützt den in den eigenen Fällen erhobenen Befund, mit einer Ratio von 1,51 pathologischen Mutationen pro Fall in der *TET2*-LOH Gruppe sind mehr Mutationen als verbliebene Allele zu detektieren (Tabelle 34).

In beiden Gruppen waren die häufigsten Mutationen Protein verkürzende Ereignisse wie *Nonsense*-, *Frameshift*- und *Splicesitemutationen*. Interessanterweise traten die verschiedenen Mutationen in identischer Relation auf (Abbildung 6).

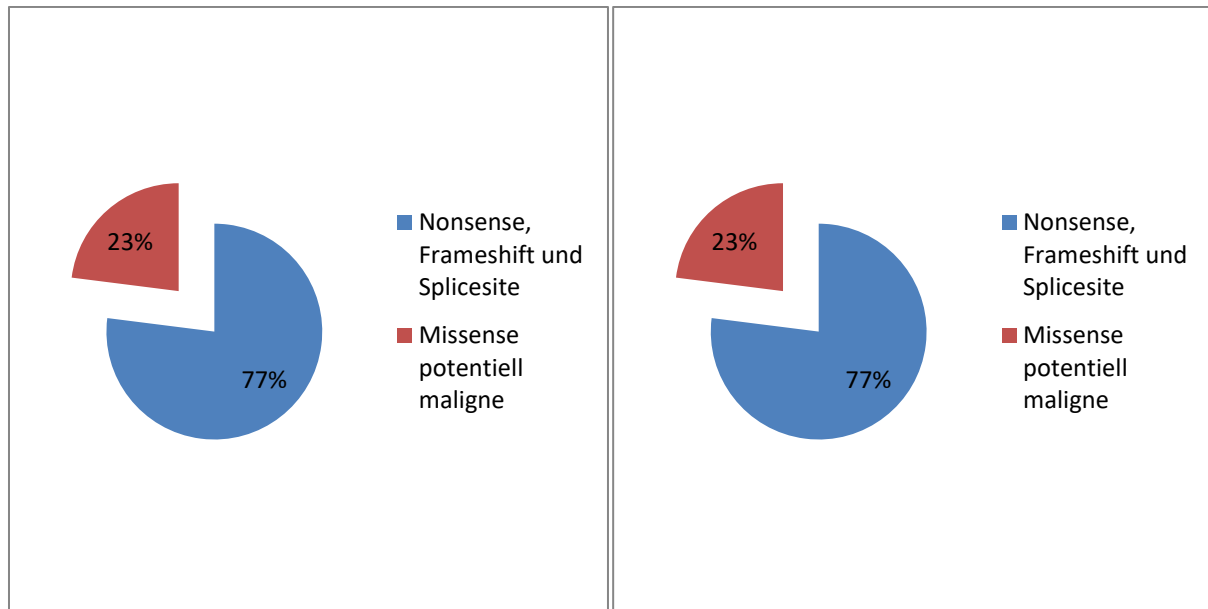


Abbildung 6. Darstellung der Mutationstypen der beiden Gruppen, auf der linken Seite ist die „Gruppe *TET2*-LOH“, auf der rechten Seite die „Gruppe *TET2*-Heterozygot“ zu sehen.

4.9. Verteilung der *TET2*-Mutationen nach Exon aller Fälle

Die *TET2*-Mutationen wurden nach betroffenem Exon aufgeschlüsselt bei den eigenen Fällen und den aus der Literatur gesammelten Fällen (Abbildung 7). Hier ergaben sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Mutationen der Gruppe der Fälle mit *TET2*-LOH für die beiden am häufigsten mutierten Exone 3 (42%) und 11 (25%) und der Gruppe der Fälle ohne *TET2*-LOH (53%; 23%). Es folgte Exon 7 (8% in der Gruppe *TET2*-LOH vs. 15% in der Gruppe ohne *TET2*-LOH), die restlichen Mutationen fallen in den einstelligen Prozentbereich. In der Gruppe *TET2*-Heterozygot waren keine Mutationen in Exon 4, 8 und 9 zu beobachten, diese Gruppe ist jedoch kleiner und das Ausbleiben von eher selten betroffenen Exonen ist daher nicht auffällig.

Es zeigt sich ein Zusammenhang die Exongröße betreffend. Je größer ein Exon, desto höher die Chance eine Mutation zu tragen, Exon 3 und 11 sind mit einer Größe von je 3.456 und 1.474 Nukleotiden die größten des *TET2*-Gens. Jedoch scheint dieser Zusammenhang nicht proportional zu sein, Exon 3 trägt 42% (Gruppe *TET2*-LOH) und 53% (Gruppe *TET2*-Heterozygot) der Mutationen und ist 23mal größer als Exon 7, welches 8% (Gruppe *TET2*-LOH) und 15% (Gruppe *TET2*-Heterozygot) der Mutationen trägt. Das Kleinste ist Exon 8 mit

90 Nukleotiden, es folgen aufsteigend Exon 4 mit 91, Exon 5 mit 94, Exon 9 mit 138, Exon mit 7 151, Exon 6 mit 209 und Exon 10 mit 355 Nukleotiden.

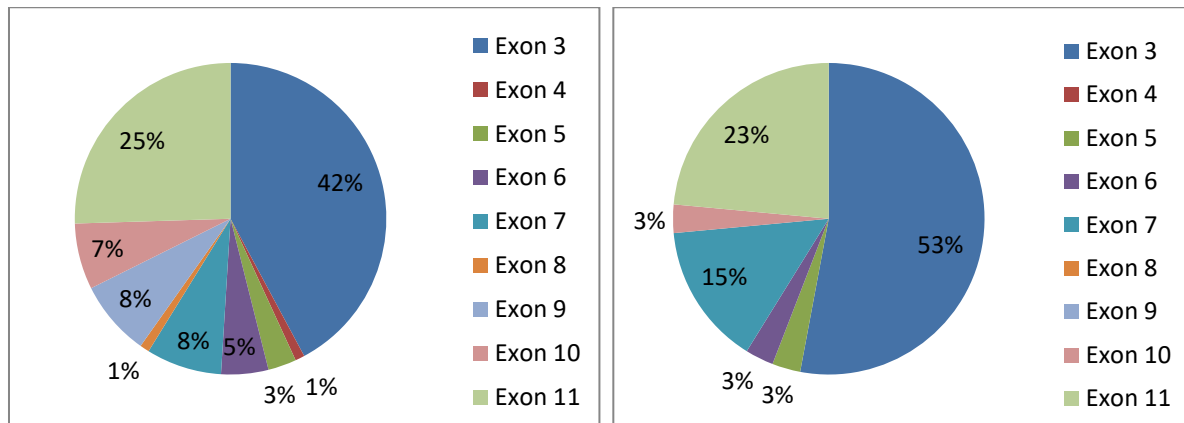


Abbildung 7. Die Verteilung der Mutationen auf die Exons des *TET2*-Gens. Auf der linken Seite ist die „Gruppe *TET2*-LOH“, auf der rechten Seite die „Gruppe *TET2*-Heterozygot“ zu sehen.

4.10. Korrelation der *TET2*-Aberrationen mit den zytogenetischen Befunden

Zuletzt wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *TET2*-Deletionen und/oder *TET2*-Mutationen und den zytogenetischen Befunden der analysierten myeloischen Fälle und der Fälle aus der Literaturrecherche untersucht.

Alle 5 *TET2*-auffälligen Fälle der eigenen Kohorte wiesen eine *TET2*-LOH auf. Bis auf Fall 38 gehörten sie zu der Gruppe 1 von Fällen mit einer unauffälligen Zytogenetik. Der Fall 38 aus der Gruppe 2 zeigte einen aberranten Karyotyp in der Chromosomen-Bänderungsanalyse mit einer 8q-Deletion und einem subklonalen 1q-Zugewinn aufgrund einer unbalancierten Translokation der(1;15)(q10;q10). Keine dieser Aberrationen gehört zu den charakteristischen Abnormalitäten der myeloischen Neoplasien.

In den 105 *TET2*-auffälligen Fällen aus der Literaturrecherche waren nicht nur die Mutationen und grundlegende Daten beschrieben, sondern es lag auch ein vollständiger zytogenetischer Befund vor, allerdings wurden für die Berechnung nur 103 miteingeschlossen, da 2 Fälle nur *TET2*-SNPs aufwiesen. Die genannten Angaben reichten von der Information, ob ein normaler oder komplexer Karyotyp vorlag bis zur Nennung des vollständigen Befundes. Ein unauffälliger Karyotyp lag in 58 der Fälle vor. Ein auffälliger Karyotyp wurde in 45 Fälle berichtet, 18 Fälle zeigten typische chromosomale myeloische Veränderungen, 18 andere chromosomalen Veränderungen und in 9 Fällen wird nur beschrieben, dass sie einen komplex aberranten Karyotyp aufwiesen.

Die Verteilung der chromosomalen Veränderung wurde in den *TET2*-LOH und *TET2*-heterozygoten Fällen separat betrachtet. Bei insgesamt 58 von 68 Fällen mit *TET2*-LOH lagen ausreichende Informationen zum Karyogramm vor, bei einer *TET2*-LOH war bei 29 von 103 Fällen (28%) eine anderweitige Aberration zu finden, in ebenfalls 29 Fällen kam die

TET2-LOH ohne weitere zytogenetische Auffälligkeiten (28%) vor. Bei insgesamt 45 Fällen ohne *TET2*-LOH oder unbekanntem *TET2*-Status hinsichtlich Deletionen lagen ebenfalls ausreichende Informationen zum Karyogramm vor, bei 16 dieser Fällen (16%) ist eine anderweitige Aberration zu finden, in 29 Fällen nicht (28%). Somit zeigt sich eine ausgeglichene Verteilung von einer *TET2*-LOH und einer *TET2*-Heterozygotie unter den myeloischen Neoplasien mit normalem oder aberrantem Karyotyp. Die Analyse der eigenen Fälle bei vorliegender *TET2*-LOH zeigte im Gegensatz dazu ausschließlich einen unauffälligen zytogenetischen Befund. Allerdings stellen die eigenen Fälle ein Kollektiv von nur fünf Fällen dar.

Bei vorliegender *TET2*-LOH häufte sich des Weiteren eine Trisomie 8 (3 Fälle), bei Patienten mit myeloischen Neoplasien ist die Trisomie 8 ein für diese Erkrankung typischer Befund (Kapitel 1.2.2). Bei vorliegender *TET2*-LOH lag keine del(20q) vor. Ohne vorliegende *TET2*-LOH mit heterozygoter Mutation häufte sich exakt die gleiche Trisomie 8 (2 Fälle), jedoch war eine Monosomie 20 zu beobachten. Monosomie 7/7q- wurde in sieben Fällen berichtet, davon nur zwei Fälle mit *TET2*-LOH.

Erwartungsgemäß sind die 6 Fälle mit einer 4q-Deletion mit einer *TET2*-Deletion und somit auch mit einer *TET2*-LOH assoziiert. Interessant ist, dass 4 weitere Fälle mit einer *TET2*-Deletion scheinbare balancierte chromosomalen Veränderungen mit Beteiligung von 4q zeigten.

5. Diskussion

Der Nachweis genetischer Mutationen ist bei der Diagnoseerstellung und Risikostratifizierung der Patienten mit myeloischen Neoplasien von Bedeutung. Mutationen im *TET2*-Gen treten als rekurrente genetische Läsion bei verschiedenen myeloischen Neoplasien auf. Dem *TET2*-Gen wird eine Funktion als Tumorsuppressorgen zugeschrieben. Über den Stellenwert von *TET2*-Mutationen in myeloischen Neoplasien wird noch diskutiert. Obwohl zahlreiche Arbeiten über die Inzidenz von *TET2*-Mutationen erschienen sind, bleiben Daten über numerischen *TET2*-Veränderungen rar.

Ziel dieser Arbeit war ein Kollektiv von 55 Patienten mit einer myeloischen Erkrankung nach numerischen und strukturellen *TET2*-Mutationen gleichzeitig zu untersuchen und Rückschlüsse hinsichtlich *TET2*-Deletionen, *TET2*-Mutationen und *TET2*-LOH zu ziehen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden zytogenetischen, molekularzytogenetischen und molekulargenetischen Verfahren eingesetzt. Ergänzend wurde das Untersuchungskollektiv mit den Daten des *TET2*-Mutationsstatus aus einer umfangreichen Literaturrecherche erweitert (Kapitel 4.6.5).

5.1. Charakterisierung des Patientenkollektivs mittels zytogenetischen und molekularzytogenetischen Techniken

In dieser Arbeit wurden mittels der FISH-Technik 55 Fälle auf die für die myeloischen Neoplasien charakteristischen Veränderungen hin untersucht. Vorangehend war eine klassische Karyotypisierung mittels Chromosomenbänderung in der Routinediagnostik erfolgt. Ergänzend dazu wurde mit einer spezifischen Sonde zum Nachweis von *TET2*-Deletionen gearbeitet.

Eine Zytogenetik wurde erfolgreich in allen untersuchten Fällen durchgeführt. Basierend auf den zytogenetischen Befunden konnten die Fälle in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Gruppe 1 beinhaltete Fälle mit einer myeloischen Neoplasie und normalem Karyotyp und die Gruppe 2 Fälle mit einer myeloischen Neoplasie und aberrantem Karyotyp.

FISH bestätigte alle zytogenetische Befunde und erweiterte die Anzahl der Veränderungen, da kryptische Aberrationen detektiert wurden. Diese traten nicht nur in *TET2*, sondern auch in *TP53*, -Y und 20q auf. Eine Ursache für die kryptischen Befunde ist, dass die Tumorzellen teils nicht in Kultur wachsen, daher werden nur normale Zellen karyotypisiert. So kann vorkommen, dass große numerische Aberrationen wie -Y nicht detektiert werden. Die andere Ursache ist, dass die Veränderungen zu klein für die Auflösung der Chromosomen-Bänderungsanalyse sind. *TP53* zum Beispiel liegt auf dem terminalen Abschnitt des kurzen Arms des Chromosoms 17 und ist häufig für die klassische Karyotypisierung unsichtbar. Im Falle von *TET2*-Deletionen aufgrund ihres interstitiellen Charakters ist diese Ursache ebenfalls zutreffend.

In Gruppe 1 wurden zwei Fälle einer kryptischen Deletion des *TET2*-Gens (Fall 22 und 30) aufgedeckt (Kapitel 4.4.1). In Gruppe 2 konnte ebenfalls eine für die klassische Zytogenetik kryptische Deletion identifiziert werden (Fall 38). Dadurch sind die ohnehin seltenen *TET2*-Deletionen in der Routinediagnostik noch schwieriger zu finden ohne einen spezifischen FISH-Assay oder SNP-Array anzuwenden. Die gefundenen kryptischen Deletionen des *TP53*-Gens in 2 von 3 Fällen zeigt auch hier eine ähnliche bekannte Problematik und unterstreicht den Stellenwert der FISH-Diagnostik in der Zytogenetik.

5.2. *TET2*-Deletionen treten am häufigsten als kryptischen Veränderungen auf. Inzidenz in myeloischen Neoplasien.

Sowohl in der Gruppe der Fälle mit einer myeloischen Neoplasie und normalem Karyotyp (Gruppe 1) als auch in der Gruppe der Fälle mit einer myeloischen Neoplasie und aberrantem Karyotyp (Gruppe 2) wurden Fälle mit einer kryptischen Deletion des *TET2*-Gens aufgedeckt. *TET2*-Deletionen machten 6% aller Fälle aus und in 100% der Fälle waren sie kryptisch. In den analysierten Literaturdaten wurde von insgesamt 2.821 Fällen nur in 1,5% (42 Fälle) eine *TET2*-Deletion nachgewiesen (Kapitel 4.7), jedoch wurde auch nicht jeder dieser Fälle hinreichend bezüglich des *TET2*-Allelstatus untersucht. In der größten mittels FISH untersuchten Kohorte von fast 900 Patienten fand sich diese in 5,6% der Fälle (Bacher et al., 2012). Eine ähnliche Größenordnung zeigte sich mit 4,7% bei der Gruppe um La Starza und Kollaboratoren (La Starza et al., 2012). In einer Kohorte von 362 brasilianischen Patienten mit myeloischen Neoplasien wurden *TET2*-Deletionen in 21 Fällen detektiert, dies entspricht einer Inzidenz von 5,8% (De Oliveira et al., 2013).

Die Wichtigkeit einer Analyse nach *TET2*-Deletionen in myeloischen Neoplasien wird offenbar, wenn die Inzidenz von kryptischen *TET2*-Deletionen ermittelt wird. In der eigenen Kohorte betrug diese 100% und in den Daten aus der Literaturrecherchen 86% (Kapitel 4.7). Auch kommen andere Arbeitsgruppen, deren Ergebnissen in dieser Arbeit nicht eingeschlossen wurden, zu einem ähnlichen Ergebnis. Bei einer Kohorte von brasilianischen Patienten mit myeloischen Dysplasien waren alle gefundenen *TET2*-Deletionen kryptisch (De Oliveira et al., 2013).

TET2 ist ein Tumorsuppressorgen (Kapitel 1.3.4). Sollte eine *TET2*-Deletion vorhanden oder auf eine andere Art und Weise ein Allel des *TET2*-Gens ausgeschaltet sein, kann es seine Schutzfunktion nicht mehr vollständig ausüben. Möglicherweise führen die Deletionen auf Dauer zu einer Akkumulation von anderen Veränderungen, welche dann nicht mehr ausreichend repariert werden können. Darunter fallen auch *TET2*-Mutationen. Diese Annahme gilt auch für eine zuerst auftretende Mutation und anschließender Deletion des *TET2*-Genes. Eine ähnliche Korrelation fiel bereits bei *TP53*, einem der bekanntesten Tumorsuppressorgene auf. Es wurde bereits 1990 ein Zusammenhang mit einer generell

erhöhten Mutationslast und einer Keimbahnmutation von *TP53* im Rahmen des Li-Fraumeni-Syndroms beschrieben (Malkin et al., 1990).

Zusammenfassend bestätigt die Analyse der eigenen und publizierten Daten, dass *TET2*-Deletionen ein seltenes Ereignis bei den myeloischen Erkrankungen sind. Es kann aber unterschätzt sein, da in 86% bis zu 100% der Fälle die *TET2*-Deletionen mittels der klassischen zytogenetischen Techniken nicht detektierbar sind. Somit sollte bei Patienten mit dem Verdacht auf eine myeloische Erkrankung eine spezifische Untersuchung, z. B. mittels FISH oder SNP-Array, für eine sichere Aussage zum Allelstatus des *TET2*-Genes erfolgen.

5.3. Analyse der Inzidenz von *TET2*-Mutationen bei myeloischen Neoplasien

5.3.1. Inzidenz von *TET2*-Mutationen in den untersuchten Kollektiven

Bei den drei identifizierten Fällen mit *TET2*-Deletionen fand sich gleichzeitig mindestens eine weitere Mutation des *TET2*-Gens auf dem verbleibenden Allel (Abbildung 8). In diesen drei Fällen lag somit eine gesicherte *TET2*-LOH aufgrund hemizygoter Mutationen vor. Damit ist die Inzidenz von weiteren Mutationen bei *TET2*-LOH für mittels Deletion 100% (Kapitel 4.5). Dazu wurden 4 Fälle mit *TET2*-Variantsequenzen ohne *TET2*-Deletionen aus der Routinediagnostik ausgewählt (Abbildung 8). In zwei Fällen erwiesen sich diese Varianten als SNPs, in zwei Fällen wurden je zwei pathologische *TET2*-Mutationen festgestellt. Es ergibt sich hier eine Inzidenz für homozygote bzw. biallelische *TET2*-Mutationen von 50%.

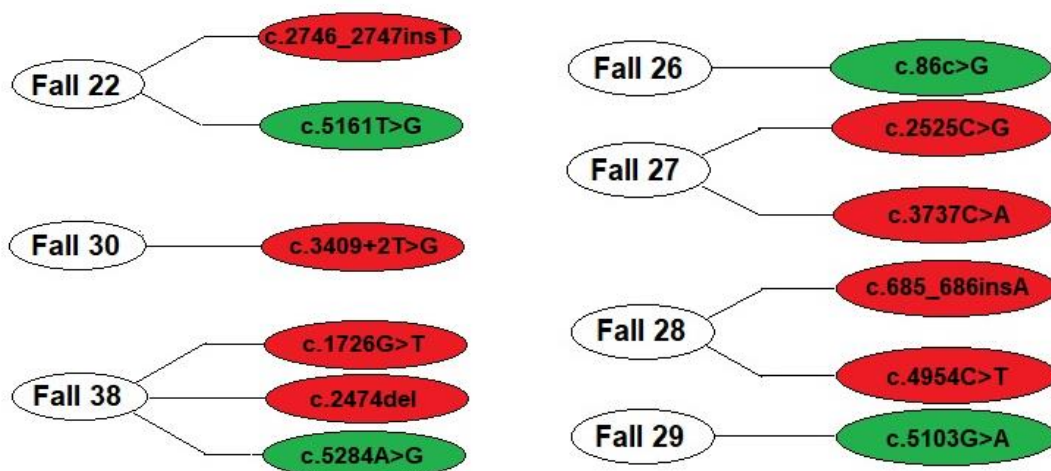


Abbildung 8. Links: Die drei Fälle mit gleichzeitiger Deletion und Mutation von *TET2* schematisch dargestellt, rot hinterlegt sind pathologische Mutationen, grün hinterlegt SNP. **Rechts:** Die vier Fälle mit Mutation von *TET2* ohne Deletion schematisch dargestellt, rot hinterlegt sind pathologische Mutationen, grün hinterlegt SNP.

Diese Häufung von hemizygoten *TET2*-Mutationen war bereits bei MDS Patienten aufgefallen (Bacher et al., 2011). Bei einer *TET2*-Deletion zeigte sich eine deutlich erhöhte Mutationsrate für das verbleibende Allel von 51,4% (Bacher et al., 2011). Die Daten dieser Studie zusammen mit denen aus weiteren 11 Arbeiten wurden in der Literaturrecherche analysiert, um diese Assoziation weiter zu untersuchen. In 41% der Fälle wurden hemizygote *TET2*-Mutationen gefunden, in 25% der Fälle homozygote *TET2*-Mutationen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, sowohl die eigenen als auch die erhobenen Fälle stützen diesen Zusammenhang. Der Verlust eines *TET2*-Allels prädisponiert für weitere Veränderungen auf dem verbleibenden Allel. Auf die möglichen Konsequenzen von hemizygoten und homozygoten *TET2*-Mutationen wird im Kapitel 5.4. eingegangen.

5.3.2. Art und Verteilung der *TET2*-Mutationen aller gesammelten Daten

Bei den eigenen Fällen mit *TET2*-Deletion imponierte eine Häufung von trunkierenden Mutationen, in Fall 38 sogar zwei auf dem verbliebenen Allel. Bei den vier Fällen mit *TET2*-Mutation ohne Deletion des *TET2*-Genes fielen ebenfalls zwei Fälle mit je zwei trunkierenden Mutationen auf. Die gesammelten Patientendaten aus der Literatur ergaben jedoch keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Verlust eines *TET2*-Allels (Kapitel 4.8). Bei Fällen mit einer *TET2*-LOH (sowohl als Folge hemizygoter als auch homozygoter *TET2*-Mutationen) traten zwar deutlich mehr pathologische Mutationen auf, jedoch unterschieden sich die Gruppen mit und ohne *TET2*-LOH nicht hinsichtlich der Art der Mutationen.

Beide Gruppen wiesen zu 23% potentiell maligne Missensemutationen auf, der Anteil der schwerwiegenden, das Proteinprodukt verkürzenden Mutationen lag bei 77%. Vergleichbare Daten wurden zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Dissertation nicht gefunden.

Die Verteilung der Mutationen auf dem *TET2*-Gen zeigte ebenfalls keine auffälligen Unterschiede zwischen der Gruppe mit und ohne *TET2*-LOH. Am häufigsten betroffen waren Exon 3 und 11, es zeigt sich ein Zusammenhang die Exongröße betreffend. Je größer ein Exon, desto höher die Chance eine Mutation zu tragen, ein proportionaler Zusammenhang besteht jedoch nicht (Kapitel 4.8.2). Diese Verteilung steht nicht im Widerspruch zu den geläufigen Befunden in der Literatur, Exon 3 und 11 sind üblicherweise als Hotspots beschrieben (Tahiliani et al., 2009). In einigen Arbeiten wurde tatsächlich nur Exon 3 und 11 des *TET2*-Genes gescreent (Buscarlet et al., 2017). Die Ergebnisse einer Arbeit von Hu und Kollaboratoren zeigte, dass das Protein TET2 die größte katalytische Aktivität zwischen Aminosäure 1129 und 1936 besitzt (Hu et al., 2014). Exon 3 liegt in der ersten konservierten Region von Aminosäure 1134 bis 1444, Exon 11 in der zweiten konservierten Region des c-terminalen Endes von Aminosäure 1842 bis 1921. Beide kodieren damit für das katalytische Zentrum des Proteins TET2 (Kapitel 1.3.3.). Der Bereich von Exon 3 kodiert außerdem für

drei Zinkionen-Bindestellen, welche unter anderem wichtig sind für die Stabilisierung der Proteinstruktur von TET2, insbesondere Deletionen im Bereich der Aminosäuren 1129–1159 (Zinkionenbindestelle 1) haben großen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzymes. Exon 11 kodiert ebenfalls für Teile der Zinkionenbindestelle 3 und hat daher auch Einfluss auf die strukturelle Stabilität des Proteins (Hu et al., 2014).

5.4. Konsequenzen von *TET2*-LOH durch hemizygote und homozygote Mutationen

Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Literaturdaten enthält ein Kollektiv von Fällen, welche mit höherer Sicherheit nur ein funktionierendes Allel von *TET2* aufweisen. Ein „Hit“ auf dem verbliebenen *TET2*-Allel reicht so bereits für ein vollständiges Ausschalten des Gens aus. Wenn nun trotzdem eine zweite oder sogar dritte Mutation auf diesem verbliebenen Allel zu finden ist, muss davon ausgegangen werden, dass auch bei nicht von einer LOH in Bezug auf *TET2* betroffenen Fällen mehr als eine Mutation auf einem Allel zu finden ist.

Bei 42 von 138 Fällen der Literaturdaten wurde sicher mittels Zytogenetik, SNP-Array oder FISH eine LOH für *TET2* festgestellt mit gleichzeitiger hemizygoter Mutation. Insgesamt wiesen vier dieser Fälle zwei, ein weiterer drei Mutationen auf. Es ist davon auszugehen, dass diese Mutationen sich alle mutmaßlich auf einem Allel sammeln. Das Auftreten eines Subklones war jedoch nicht in jedem dieser Fälle sicher ausgeschlossen.

Eine weitere Annahme über *TET2*-Mutationen fiel im Rahmen der Literaturrecherche insbesondere in den jüngeren Publikationen auf. In der Mehrzahl der gesichteten Arbeiten wurde das Auftreten von zwei oder mehr Mutationen des *TET2*-Gens gleichgesetzt mit Homozygotie ohne den *TET2*-Allelstatus genau erhoben zu haben. Häufig wurde mittels NGS nach *TET2*-Mutationen gescreent und Untersuchungen wie SNP-Array oder FISH blieben außen vor. Auch auf eine Zytogenetik wurde im Studiendesign häufig verzichtet. In dieser Dissertation wurden ebenfalls 26 von 139 Fällen unter den publizierten Daten als homozygot mutiert eingestuft, um im Einklang mit den Publikationen zu arbeiten.

Sollte nun ein nicht von *TET2*-LOH betroffener Fall mehrere Mutationen auf einem Allel ansammeln, besteht die Gefahr ohne die Überprüfung des Allelstatus fälschlicherweise eine Homozygotie in Bezug auf die *TET2*-Mutationen anzunehmen.

Die hier analysierten Daten zeigen, dass Fälle mit nur ein *TET2*-Allel mehrere Mutationen zeigen können (ein Fall in der eigenen Kohorte und vier Fälle der Recherche). Allerdings kann man nicht ausschließen, dass eine *TET2*-Deletion zuerst entsteht. Aus der veränderten Zelle würden dann zwei unterschiedliche Subklone mit unterschiedlichen Mutationen entstehen. In diesem Zusammenhang wäre die Annahme von zwei Mutationen als biallelische Mutationen doch korrekt. Allerdings wurden auch Patienten ohne *TET2*-Deletionen mit bis zu vier *TET2*-Mutationen identifiziert. Die verschiedenen Möglichkeiten der

Verteilung dieser Mutationen auf zwei Allele oder ggf. das Vorliegen einer komplexen subklonalen Heterogenität sollte in zukünftigen Experimenten getestet werden.

Aber auch in dem Fall, dass eine heterozygote Deletion vorliegt, kann man ohne weitere Analyse des *TET2*-Allelstatus nicht sicher sein, dass es sich hier nicht um eine hemizygote Mutation handelt. Hinzu kommt, dass so viele *TET2*-Deletionen kryptisch sind und man aktiv nach ihnen suchen muss.

Diese Annahmen könnten Konsequenzen für die Patientenversorgung haben, fast jeder 5. Fall könnte als falsch homozygot oder falsch heterozygot mutiert eingeschätzt werden. Eine klinische Relevanz von homozygoten *TET2*-Mutationen im Vergleich zu heterozygoten *TET2*-Mutationen bei myeloischen Neoplasien ist zwar bislang nicht sicher nachgewiesen, jedoch zeigen sich in vitro und im Tiermodell Hinweise auf einen signifikanten Effekt (Kapitel 1.3.4).

Im Tiermodell zeigt das *TET2*-Gen eine dosisabhängige Tumorsuppressorfunktion. Das Ausschalten eines Allels reicht für Effekte aus, ein vollständiger Verlust der *TET2*-Funktion verstärkt diese. Eine retrospektive Studie verglich direkt von einer AML betroffene Patienten mit einer heterozygoten *TET2*-Mutation im Vergleich zu Patienten mit einer homozygoten *TET2*-Mutation. Für heterozygot betroffene AML-Patienten ergab sich kein klinisch signifikanter Unterschied. AML-Patienten mit einer homozygoten *TET2*-Mutation hatten eine signifikant erhöhte Inzidenzrate von Rezidiven. Die Inzidenz von homozygot Betroffenen lag bei 26% (Ahn et al., 2015).

Sollte sich ggf. in weiteren Studien vermehrt eine klinische Relevanz von homozygoten *TET2*-Mutationen bei myeloischen Neoplasien bestätigen, könnte dies Einzug in die Therapieschemata erhalten. Patienten, welche homozygote *TET2*-Mutationen aufweisen, könnten in andere Behandlungsgruppen eingeordnet werden und zum Beispiel stärkere Chemotherapeutika erhalten. Einer von 5 potentiell falsch eingeordneten Patienten ist nicht tolerabel. Im Umkehrschluss würde aus einer heterozygoten Mutation bei gleichzeitiger kryptischer Deletion eine hemizygote Mutation werden. Ein Patient könnte so potentiell falsch als heterozygot mutiert eingeordnet werden und möglicherweise eine weniger potente Therapie erhalten. Die Erhebung des Allelstatus des *TET2*-Genes, zum Beispiel schnell und kostengünstig durch FISH könnte einen höheren Stellenwert erhalten.

5.4.1. Korrelation von *TET2*-Deletionen und weiteren zytogenetischen Aberrationen zeigen keine Assoziation

In der Vergangenheit wurden eine Koinzidenz von *TET2*-Deletionen mit Deletionen von 5q und 7q beobachtet, insbesondere beim MDS (La Starza et al., 2012). Es handelte sich um jeweils einen Fall mit gleichzeitiger Deletion 7q- und *TET2* sowie Deletion 5q- und *TET2*. Es

wurde vermutet, dass die *TET2*-Veränderungen den anderen vorangehen würden und möglicherweise eine Häufung mit gleichzeitiger Deletion 7q- und Deletion 5q- vorliegen könnte. In dieser Arbeit wurden bei den Fällen ohne *TET2*-Deletion acht Fälle mit einer 5q-Deletion, fünf Patienten mit einer 20q-Deletion und zwei Patienten mit einer Monosomie 7 gefunden. Ein Zusammenhang zwischen Deletion 7q-, Deletion 5q- und *TET2*-Deletionen konnte hier somit nicht gesichert werden. Bei dem eigenen untersuchten Kollektiv wurden drei Fälle mit einer *TET2*-Deletion festgestellt. Ein Zusammenhang der drei Fälle mit *TET2*-Deletion und anderen chromosomalen Veränderungen wurde hier nicht gefunden, die *TET2*-Deletionen waren isoliert aufgetreten.

In dieser Arbeit wurden die zytogenetischen Daten aus der Literaturrecherche, einschließlich der o. g. Arbeit um La Starza und Kollaboratoren, unter Berücksichtigung der *TET2*-Mutation Art (Hemizygot, Homozygot oder Heterozygot) untersucht. Die Datenlage dazu ist widersprüchlich. In der Publikation von Bacher et al., 2011 wiesen nur 30% der Fälle bei gleichzeitiger *TET2*-Deletion ein unauffälliges Karyogramm auf. Eine andere Arbeit spricht von 72% der Fälle mit unauffälliger Zytogenetik und gleichzeitiger *TET2*-Deletion (De Oliveira et al., 2013). Die Analyse der eigenen Fälle bei vorliegender *TET2*-LOH (davon drei mit LOH durch Deletion) zeigte eine Akkumulation von *TET2*-LOH bei Fällen mit einem normalen Karyotyp, allerdings ist das Kollektiv mit fünf Fällen sehr klein (Kapitel 4.8.2). Als alle verfügbaren Daten aus der Literatur analysiert wurden, zeigte sich insgesamt eine ausgeglichene Verteilung von einer *TET2*-LOH und einer *TET2*-Heterozygotie unter den myeloischen Neoplasien mit normalem oder aberrantem Karyotyp. Da in dieser Arbeit eine große Anzahl an eigenen und publizierten Daten zusammen ausgewertet wurde, deuten die erhobenen Daten darauf hin, dass *TET2*-LOH und *TET2*-Heterozygotie sowohl als einzige Veränderung als auch im Rahmen eines aberranten Karyotyps auftreten können.

5.4.2. Analyse der einzelnen *TET2*-Mutationen und SNPs der eigenen Kohorte

***TET2*-Mutationen im Fall 22**

1) NM_001127208.2: c.2746_2747insT p.(Gln916Leufs*8)

Nach Recherche in der SNP-Datenbank (NCBI) und ExAC (Broad Institute) ist diese Veränderung bisher nicht dokumentiert. Es werden für die gleiche Stelle in ExAC zwei ähnliche Veränderungen angegeben, welche einmal zu einem Stopcodon und einmal zu einem Frameshift führen (NM_001127208.2:c.2746C>T; p.Gln916* und NM_001127208.2:c.2743_2744insCT; Gln916Leufs*6). Die SNP-Datenbank führt die zweite dieser Veränderungen unter der Referenznummer „rs779248677“ an, die Allelfrequenz (ExAC) in der Bevölkerung geht gen Null, weitere Daten werden nicht angegeben.

In einer Kohorte mit AML-Patienten war eine ähnliche Mutation gleich drei Mal aufgetreten (NM_001127208:c.2746C>T; p.Gln916*), diese führte zu einem Stopcodon (Metzeler et al., 2011). In unmittelbarer Nähe wurden zwei Nonsense-Mutationen identifiziert (NM_001127208:c. 2797C>T; p.Gln933* und NM_001127208:c.2800G>T; p.Gln934*) die einen Patienten mit Mastrozytose (Soucie et al., 2012) und einen Patienten mit AML (Weissmann et al., 2011) betrafen. Interessant ist ein Fallbericht einer 68-jährigen MDS-Patienten (Coutinho et al., 2013) mit einer Nonsense-Mutation (NM_001127208:c.2737C>T; p.Gln913*) auf einem Allel, welches zu einem Stopcodon führt. 10 Monate später kam es zu einer Transformation in eine AML. Ebenfalls in direkter Nähe auf Exon 3 ist eine Veränderung bei einem Patienten mit einer CMML gefunden worden (NM_001127208:c.2710C>T; p.Gln904*) (Kohlmann et al., 2010).

2) NM_001127208.2: c.5161T>G p.(Leu1721Val)

Eine exakt identische Veränderung ist nicht beschrieben. Es gibt an der gleichen Position laut „ExAC“ und der SNP-Datenbank sowie „ClinVAR“ eine verbreitete Veränderung unter der Referenznummer „rs34402524“ (NM_001127208.2:c.5162T>G; p.Leu1721Trp) mit einer Allelfrequenz von 0.12907 (ExAC). Bei dieser handelt es sich um einen SNP, welche schon in Keimzellen zu finden ist (Bodian et al., 2014).

TET2-Mutation im Fall 30

1) NM_001127208.2: c.3409+2T>G

Diese Mutation ist bereits in Cosmic beschrieben (ID: COSM4170050), diese Veränderung wurde bei einem Patienten mit einem Angioimmunoblastischen T-Zell Lymphom gefunden (Odejide et al., 2013). In ExAC wird eine Veränderung mit dem gleichen Resultat gezeigt (NM_001127208.2:c.3409+1G>A), weiterführende Daten werden jedoch nicht aufgeführt.

TET2-Mutationen im Fall 38

1) NM_001127208.2: c.1726G>T p.(Glu576*)

In ExAC findet sich eine vergleichbare Mutation, welche ebenfalls ein Stopcodon bildet (4:106156768 C/T; p.Gln557*). Diese ist nur einmalig beschrieben, weitere Daten sind nicht verfügbar. Bei einem Fall mit blastischer Neoplasie plasmazytoider dendritischer Zellen wurde ebenfalls eine Nonsensemutation an ähnlicher Position identifiziert (NM_001127208.2:c.1691G>A p.W564*) (Alayed et al., 2013). Insgesamt wurden 6 Veränderungen gefunden, es waren alle auf Exon 3 oder 11, 5/6 waren *Frameshift* oder Nonsensemutationen. Bei einem Fall mit MDS, Subtyp RAEB wurde eine *Frameshiftmutation* beschrieben (NM_001127208.2:c.1680_1681ins p.K561fs) (Itzykson et al., 2013). Ein

weiterer MDS-Patient weist eine ähnliche Nonsensemutation auf (NM_001127208:C1763C>A p.Ser588*) (Bacher et al., 2011). Auch bei 2 AML-Patienten war eine ähnliche Nonsensemutation zu sehen (NM_001127208.2:c.1669C>T p.Gln557* und NM_001127208.2:c.1747G>T p.Glu583X) (Metzeler et al., 2011).

2) NM_001127208.2: c.2474del p.(Ser825*)

Eine Mutation mit gleicher Auswirkung (NM_001127208: c.2474C>G; p.Ser825*) ist bei einem Patienten mit einer AML beschrieben (Metzeler et al., 2011). Auch gibt es laut ExAC einige vergleichbare Mutationen in der Umgebung, welche einen *Frameshift* verursachen (4:106157504 TC / T; p.Gln803LysfsTer10, 4:106157539 CG / C; p.Arg814LeufsTer10, 4:106157546 AT / A; p.Ser817ProfsTer7 und 4:106157608 AAT / A; p.His839ProfsTer6), diese sind Einzelfälle. Klinische Daten zu diesen Mutationen waren nicht verfügbar.

3) NM_001127208.2: c.5284A>G p.(Ile1762Val)

Hierbei handelt es sich um einen bekannten SNP, zu finden unter der ID „rs2454206“ des „NCBI 1000 Genome Browser“. Eine klinische Relevanz wurde bisher nicht beobachtet (ClinVar, NCBI). Der PolyPhen-2 Score ergibt keinen Hinweis auf eine Störung der Proteinfunktion.

Alle 3 Fälle (22, 30 und 38) mit *TET2*-Mutationen und gleichzeitiger *TET2*-Deletion haben mindestens eine schwerwiegende Mutation welche mit hoher Wahrscheinlichkeit das Proteinprodukt unbrauchbar macht. Gleiche oder ähnliche Mutationen traten häufig bei Fällen mit AML und MDS, vereinzelt aber auch bei einem T-Zell-Lymphom und einer Plasmazell-Neoplasie auf. Nebenbefundlich fiel eine bislang nicht dokumentierte SNP in Fall 22 auf. Abbildung 8 (Kapitel 5.3.2.) gibt einen schematischen Überblick.

5.4.3. *TET2*-Mutationen ohne gleichzeitige *TET2*-Deletion (FISH)

***TET2*-Mutation im Fall 26**

1) NM_001127208.2: c.86C>G p.(Pro29Arg)

Sie ist laut SNP-Datenbank (NCBI) unter der Nummer „rs12498609“ als bekannte SNP hinterlegt. Es wird eine Allelfrequenz von 0.06 (ExAC) angegeben, eine klinische Signifikanz (ClinVar) ist nicht beschrieben. Dennoch lässt der PolyPhen-2 Score (0.868) auf eine Störung der Proteinfunktion schließen. Diese Mutation ebenfalls bereits in Cosmic beschrieben (ID: COSM5020249), diese Veränderung wurde bei zwei Patienten mit einer AML gefunden (Hirsch et al., 2013).

TET2-Mutationen im Fall 27

1) *NM_001127208: c.2525C>G p.(S842*)*

Diese Mutation bereits in Cosmic beschrieben (ID: COSM5878980), diese Veränderung wurde bei einem Patienten mit AML detektiert (Metzeler et al., 2016). Ebenfalls interessant ist eine andere Mutation mit gleicher Konsequenz (NM_001127208: c.2525C>A, ID: COSM41882) welche einmal in einer Kohorte von MDS-Patienten auftrat (Langemeijer et al., 2009).

2) *NM_001127208: c.3737C>A p.(S1246*)*

Exakt die gleiche Mutation ist in Cosmic beschrieben (ID: COSM1168024), sie trat bei einem Patienten mit Mastozytose auf (Soucie et al., 2012).

TET2-Mutationen im Fall 28

1) *NM_001127208 (TET2): c.685_686insA p.Thr229Asnfs*25*

Diese Mutation ist in Cosmic beschrieben (ID: COSM5020249). Sie wurde bei zwei Patienten mit einer AML gefunden (Chou et al., 2011). Nach Recherche in der SNP-Datenbank (NCBI) und ExAC (Broad Institute) ist diese Veränderung bisher nicht dokumentiert.

2) *NM_001127208 (TET2): c.4954C>T p.Gln1652**

Diese Mutation ist ebenfalls in Cosmic beschrieben (ID: COSM4170053), sie trat bei einem Patienten mit Angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom auf (Odejide et al., 2013). Sie ist mit dem FATHMM-Score von 0,9 als pathogen eingestuft.

TET2-Mutation im Fall 29

1) *NM_001127208.2 (TET2): c.5103G>A p.Met1701Ile*

Laut PolyPhen-2 Score von 0,01 ist dies eine benigne Veränderung, laut ExAC (Broad Institute) ist diese Veränderung bekannt. Es ist eine SNP (rs62623390), eine klinische Relevanz wurde bisher nicht beobachtet (ClinVar, NCBI).

Die vier aus der Routinediagnostik stammenden Fälle (26-29) ohne TET2-Deletionen haben nicht alle pathogene Mutationen. Zwei Fälle haben zwar jeweils zwei sicher pathogene Mutationen gleichzeitig, zwei weitere Fälle weisen jedoch nur jeweils eine SNP auf. Gleiche oder ähnliche Mutationen traten häufig bei AML und MDS auf, jedoch auch einmal bei einer Mastozytose und bei einem T-Zell-Lymphom. Die SNP in Fall 26 ist ein Grenzfall, eine Häufung dieser SNP bei AML-Fällen wurde beschrieben (Hirsch et al., 2013). Abbildung 9

(Kapitel 5.3.2.) gibt einen schematischen Überblick. Die Fälle welche von einer *TET2*-LOH betroffen sind, weisen mehr pathologische Mutationen auf, als jene ohne LOH. Auch die Ratio der Mutationen pro Fall aus den Literaturdaten stützt dies (Kapitel 4.6.1). Die Fälle mit LOH wiesen 1,51 pathologische Mutationen auf, während die Fälle ohne LOH nur 0,97 pathologische Mutationen zu verzeichnen hatten. Dies passt zu der Annahme, dass *TET2*-Mutationen weitere Veränderungen nach sich ziehen (Kapitel 5.3.1).

6. Zusammenfassung

TET2-Deletionen und *TET2*-Mutationen bei myeloischen Neoplasien kommen selten vor, allerdings variiert leicht zwischen den einzelnen Entitäten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das *TET2*-Mutationsspektrums mit weiteren zytogenetischen Aberrationen in Zusammenhang zu bringen unter Berücksichtigung der *TET2*-LOH durch Deletion oder biallelische Mutationen.

Es zeigte sich eine ausgeglichene Verteilung von einer *TET2*-LOH und einer *TET2*-Heterozygotie unter den myeloischen Neoplasien mit normalem oder aberrantem Karyotyp, dazu fiel auf, dass die meisten der *TET2*-Deletionen kryptisch die die Chromosomen-Bänderungsanalyse waren. Die Verteilung der Mutationen auf die Exone ergab zwischen den beiden Gruppen keine nennenswerten Unterschiede, Exon 3 und 11 waren jeweils am häufigsten betroffen.

Mit einer Inzidenz von ca. 5% sind *TET2*-Deletionen bei myeloischen Neoplasien ein seltenes Ereignis, könnten aber wegen der hohen Anzahl von kryptischen Befunden unterschätzt sein. Sollte ein Allel durch eine Deletion oder Mutation ausgeschaltet worden sein, treten auf dem verbliebenen Allel häufiger Mutationen des *TET2*-Gens auf. Oft finden sich Nonsense oder *Frameshiftmutationen*, diese führen zu einem verkürzten und damit unbrauchbaren Protein. Die prognostische Relevanz ist umstritten, es zeigte sich ein Widerspruch zwischen Genexpression und aufgetretenen Mutationen. Aktuelle Erkenntnisse zeigen für homozygot betroffene Patienten eine mögliche klinische und prognostische Relevanz. Dies macht die Unterscheidung zwischen heterozygot und homozygot betroffenen Patienten interessant.

Um die zytogenetischen Befunde mit möglichen *TET2*-Mutationen zu korrelieren wurden drei Fälle mit aberrantem *TET2*-Befunden nach der FISH mittels DNA-Sequenzierungsverfahren nach *TET2*-Mutationen weiter untersucht. Interessanterweise wurden Mutationen des *TET2*-Gens in allen Fällen detektiert. Bei zwei Fällen traten jeweils zwei und drei *TET2*-Mutationen gleichzeitig auf und bei einem Fall trat eine einzige *TET2*-Mutation auf.

Zusammengefasst wurden drei eigene Fälle und 42 Fälle aus der Literatur mit einer gesicherten *TET2*-LOH durch Deletion sowie zwei eigene Fällen und 26 Fälle aus der Literatur mit einer hochwahrscheinlichen *TET2*-LOH identifiziert. Die Ergebnisse der eigenen- und der Literaturdaten deuten darauf hin, dass mehrere *TET2*-Mutationen auf einem *TET2*-Allel auftreten können, mehrere *TET2*-Mutationen müssen nicht zwingend auf eine Verteilung auf beide Allele führen.

Rund jeder 5. Fall könnte zwei oder mehr Mutationen auf einem Allel aufweisen und wäre aufgrund dieser Annahme falsch als homozygot betroffen eingestuft worden. Dies hätte sowohl Konsequenzen für die bislang erfolgte Auswertungspraxis als auch möglicherweise

klinische Konsequenzen. Auch die Detektion einer möglichen eher seltenen und oft für die Chromosomen-Bänderungsanalyse kryptische *TET2*-Deletion hätte einen höheren Stellenwert, denn auch der Verlust eines *TET2*-Alleles zusammen mit einer hemizygoten Mutation hinterlässt keine funktionierende Genkopie mehr und ein Patient wäre falsch heterozygot eingestuft

Sollte eine solche Deletion gefunden werden, ist bei Patienten mit myeloischen Neoplasien eine Suche nach *TET2*-Mutationen auf dem verbleibenden Allel lohnenswert. Dieser Zusammenhang sollte in weiteren Untersuchungen bestätigt und unter Berücksichtigung von Subklonen myeloischer Neoplasien überprüft werden.

7. Ausblick

Im Rahmen der Diagnose einer myeloischen Neoplasie kann je nach Entität eine Untersuchung des *TET2*-Gens sinnvoll sein. Jedoch sollte zur genauen Bestimmung des *TET2*-Lokusstatus eine ergänzende Untersuchung durchgeführt werden. Dies kann leicht mittels FISH in Kombination mit NGS oder *Whole Genome Sequencing* geschehen.

Es sollte eruiert werden, ob Mutationen ein Allel oder beide Allele des *TET2*-Gens ausschalten. Diese Ergebnisse sollten mit klinischen Daten korreliert werden, um eine bessere Prognose der Patienten zu ermöglichen. Diese Daten könnten einen Hinweis geben, wieso *TET2*-Mutationen so viele widersprüchliche Aussagen hinsichtlich der prognostischen Bedeutung myeloischer Patienten haben.

8. Literaturverzeichnis

Abáigar M, Robledo C, Benito R, Ramos F, Díez-Campelo M, Hermosín L, Sánchez-Del-Real J, Alonso JM, Cuello R, Megido M, Rodríguez JN, Martín-Núñez G, Aguilar C, Vargas M, Martín AA, García JL, Kohlmann A, Del Cañizo MC, Hernández-Rivas JM. Chromothripsis Is a Recurrent Genomic Abnormality in High-Risk Myelodysplastic Syndromes. *PloS One*. 2016 Oct 14;11(10):e0164370.

Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, Malinge S, Yao J, Kilpivaara O, Bhat R, Huberman K, Thomas S, Dolgalev I, Heguy A, Paietta E, Le Beau MM, Beran M, Tallman MS, Ebert BL, Kantarjian HM, Stone RM, Gilliland DG, Crispino JD, Levine RL. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009 Jul 2;114(1):144-7.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010 Apr;7(4):248-9.

Ahn JS, Kim HJ, Kim YK, Jung SH, Yang DH, Lee JJ, Lee IK, Kim NY, Minden MD, Jung CW, Jang JH, Kim HJ, Moon JH, Sohn SK, Won JH, Kim SH, Kim N, Yoshida K, Ogawa S, Kim DD. Adverse prognostic effect of homozygous TET2 mutation on the relapse risk of acute myeloid leukemia in patients of normal karyotype. *Haematologica*. 2015 Sep;100(9):e351-3.

Alayed K, Patel KP, Konoplev S, Singh RR, Routbort MJ, Reddy N, Pemmaraju N, Zhang L, Shaikh AA, Aladily TN, Jain N, Luthra R, Medeiros LJ, Khoury JD. TET2, myelodysplastic features, and a distinct immunoprofile characterize blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in the bone marrow. *Am J Hematol*. 2013 Dec;88(12):1055-61.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405.

Bacher U, Weissmann S, Kohlmann A, Schindela S, Alpermann T, Schnittger S, Kern W, Haferlach T, Haferlach C. TET2 deletions are a recurrent but rare phenomenon in myeloid malignancies and are frequently accompanied by TET2 mutations on the remaining allele. *Br J Haematol*. 2012 Jan;156(1):67-75.

Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, Ebert BL. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364:2496-506.

Buscarlet M, Tessier A, Provost S, Mollica L, Busque L. Human blood cell levels of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) decline with age, partly related to acquired mutations in TET2. *Exp Hematol*. 2016 Nov;44(11):1072-1084.

Buscarlet M, Provost S, Zada YF, Barhdadi A, Bourgoïn V, Lépine G, Mollica L, Szuber N, Dubé MP, Busque L. DNMT3A and TET2 dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions. *Blood*. 2017 Aug 10;130(6):753-762.

Dale L. Bodian, Justine N. McCutcheon, Prachi Kothiyal, Kathi C. Huddleston, Ramaswamy K. Iyer, Joseph G. Vockley, John E. Niederhuber. Germline variation in cancer-susceptibility genes in a healthy, ancestrally diverse cohort: implications for individual genome sequencing. *PloSOne*. 2014 Apr 11;9(4):e94554.

COSMIC (Catalogue of somatic mutations in cancer). Simon A. Forbes, David Beare, Harry Boutselakis, Sally Bamford, Nidhi Bindal, John Tate, Charlotte G. Cole, Sari Ward, Elisabeth Dawson, Laura Ponting, Raymund Stefancsik, Bhavana Harsha, Chai Yin Kok, Mingming Jia, Harry Jubb, Zbyslaw Sondka, Sam Thompson, Tisham De, Peter J. Campbell; COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution, *Nucleic Acids Research*, Volume 45, Issue D1, 4 January 2017, Pages D777–D783.

<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=4170050>

Chou WC, Chou SC, Liu CY, Chen CY, Hou HA, Kuo YY, Lee MC, Ko BS, Tang JL, Yao M, Tsay W, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Chang YC, Kuo YY, Kuo KT, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, Tien HF. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3803-10.

Coutinho DF, Diniz C, Filgueiras RL, Baptista RL, Ayres-Silva JP, Monte-Mór BC, Bonamino MH, Zalcberg IR. Case report: A novel TET2 mutation in a patient with refractory cytopenia with multilineage dysplasia. *Genet Mol Res*. 2013 Nov 22;12(4):5858-62.

De Oliveira FM, Miguel CE, Lucena-Araujo AR, de Lima AS, Falcão RP, Rego EM. FISH analysis for TET2 deletion in a cohort of 362 Brazilian myeloid malignancies: correlation with karyotype abnormalities. *Med Oncol*. 2013 Mar;30(1):483.

Ensembl genome browser. Homo sapiens - Gene summary - Gene: TET2 (ENSG00000168769). (Accessed November 5, 2018 at https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Regulation?db=core;g=ENSG00000168769;r=4:105145875-105279816)

François Delhommeau, Pharm.D., Ph.D., Sabrina Dupont, Ph.D., Véronique Della Valle, Ph.D., Chloé James, M.D., Ph.D., Severine Trannoy, B.S., Aline Massé, Ph.D., Olivier Kosmider, Pharm.D., Ph.D., Jean-Pierre Le Couedic, B.S., Fabienne Robert, Ph.D., Antonio Alberdi, Ph.D., Yann Lécluse, B.S., Isabelle Plo, Ph.D., François J. Dreyfus, M.D., Christophe Marzac, M.D., Nicole Casadevall, M.D., Catherine Lacombe, M.D., Ph.D., Serge P. Romana, M.D., Ph.D., Philippe Dessen, M.D., Ph.D., Jean Soulier, M.D., Ph.D., Franck Viguié, M.D., Michaela Fontenay, M.D., Ph.D., William Vainchenker, M.D., Ph.D., and Olivier A. Bernard, Ph.D. Mutation in *TET2* in Myeloid Cancers, *N Engl J Med* 2009; 360:2289-2301.

FATHMM-Prediction score. Shihab HA, Rogers MF, Gough J, Mort M, Cooper DN, Day INM, Gaunt TR, Campbell C (2014). An Integrative Approach to Predicting the Functional Consequences of Non-coding and Coding Sequence Variation (In Press). <http://fathmm.biocompute.org.uk/cgi-bin/results.cgi?session=737b27a0-b86f-456c-9359-dffbf2795687>

Fernandez-Mercado M, Yip BH, Pellagatti A, Davies C, Larrayoz MJ, Kondo T, Pérez C, Killick S, McDonald EJ, Otero MD, Agirre X, Prósper F, Calasanz MJ, Wainscoat JS, Boulwood J. Mutation patterns of 16 genes in primary and secondary acute myeloid leukemia (AML) with normal cytogenetics. *PLoS One*. 2012;7(8):e42334.

Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landén M, Höglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Grönberg H, Hultman CM, McCarroll SA. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014 Dec 25;371(26):2477-87.

Germing U, Kobbe G, Haas R, Gattermann N. Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(46):783-90.

Granatowicz A, Piatek CI, Moschiano E, El-Hemaidi I, Armitage JD, Akhtari M. An Overview and Update of Chronic Myeloid Leukemia for Primary Care Physicians. *Korean J Fam Med.* 2015 Sep;36(5):197-202.

Hu L, Li Z, Cheng J, Rao Q, Gong W, Liu M, Shi YG, Zhu J, Wang P, Xu Y. Crystal structure of TET2-DNA complex: insight into TET-mediated 5mC oxidation. *Cell.* 2013 Dec 19;155(7):1545-55.

Peter L. Greenberg, Heinz Tuechler, Julie Schanz, Guillermo Sanz, Guillermo Garcia-Manero, Francesc Solé, John M. Bennett, David Bowen, Pierre Fenaux, Francois Dreyfus, Hagop Kantarjian, Andrea Kuendgen, Alessandro Levis, Luca Malcovati, Mario Cazzola, Jaroslav Cermak, Christa Fonatsch, Michelle M. Le Beau, Marilyn L. Slovak, Otto Krieger, Michael Luebbert, Jaroslaw Maciejewski, Silvia M. M. Magalhaes, Yasushi Miyazaki, Michael Pfeilstöcker, Mikkael Sekeres, Wolfgang R. Sperr, Reinhard Stauder, Sudhir Tauro, Peter Valent, Teresa Vallespi, Arjan A. van de Loosdrecht, Ulrich Germing, Detlef Haase. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood* Sep 2012, 120 (12) 2454-2465.

Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koefler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2014 Feb;28(2):241-7.

Hemmat M, Chen W, Anguiano A, Naggar ME, Racke FK, Jones D, Wang Y, Strom CM, Chang K, Boyar FZ. Submicroscopic deletion of 5q involving tumor suppressor genes (CTNNA1, HSPA9) and copy neutral loss of heterozygosity associated with TET2 and EZH2 mutations in a case of MDS with normal chromosome and FISH results. *Mol Cytogenet.* 2014 May 27;7:35.

Hirsch P, Zhang Y, Tang R, Joulin V, Boutroux H, Pronier E, Moatti H, Flandrin P, Marzac C, Bories D, Fava F, Mokrani H, Betems A, Lorre F, Favier R, Féger F, Mohty M, Douay L, Legrand O, Bilhou-Nabera C, Louache F, Delhommeau F. Genetic hierarchy and temporal

variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nat Commun.* 2016 Aug 18;7:12475.

Huang Y, Rao A. Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer. *Trends Genet.* 2014;30(10):464-74.

Hussaini MO, Mirza AS, Komrokji R, Lancet J, Padron E, Song J. Genetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia Interrogated by Next-generation Sequencing: A Large Cancer Center Experience. *Cancer Genomics Proteomics.* 2018 Mar-Apr;15(2):121-126.

Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES - cell self - renewal and inner cell mass specification. *Nature.* 2010;466(7310):1129–1133.

Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Morabito M, Preudhomme C, Berthon C, Adès L, Fenaux P, Platzbecker U, Gagey O, Rameau P, Meurice G, Oréar C, Delhommeau F, Bernard OA, Fontenay M, Vainchenker W, Droin N, Solary E. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood.* 2013 Mar 21;121(12):2186-98.

Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberger D, Altshuler D, Ebert BL. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014 Dec 25;371(26):2488-98.

Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, Makishima H, Afile M, Huh J, O'Keefe CL, Ganetzky R, McDevitt MA, Maciejewski JP. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009 Jun 18;113(25):6403-10.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Jun;12(6):996-1006.

Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R, Liu XS, Aravind L, Agarwal S, Maciejewski JP, Rao A. Impaired

hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010 Dec 9;468(7325):839-43.

Ko M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Thompson EC, Hastie R, Tsangaratou A, Rajewsky K, Koralov SB, Rao A. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 30;108(35):14566-71.

Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, Schindela S, Weiss T, Kazak B, Dicker F, Schnittger S, Dugas M, Kern W, Haferlach C, Haferlach T. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 20;28(24):3858-65.

Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, Grabar S, Della-Valle V, Picard F, Viguié F, Quesnel B, Beyne-Rauzy O, Solary E, Vey N, Hunault-Berger M, Fenaux P, Mansat-De Mas V, Delabesse E, Guardiola P, Lacombe C, Vainchenker W, Preudhomme C, Dreyfus F, Bernard OA, Birnbaum D, Fontenay M; Groupe Francophone des Myélodysplasies. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*. 2009 Oct 8;114(15):3285-91.

Kosmider O, Delabesse E, de Mas VM, Cornillet-Lefebvre P, Blanchet O, Delmer A, Recher C, Raynaud S, Bouscary D, Viguié F, Lacombe C, Bernard OA, Ifrah N, Dreyfus F, Fontenay M; GOELAMS Investigators. TET2 mutations in secondary acute myeloid leukemias: a French retrospective study. *Haematologica*. 2011 Jul;96(7):1059-63.

Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van Hoogen P, van Kessel AG, Raymakers RA, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenbergh P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2009 Jul;41(7):838-42.

Langner D, Richter J, Nagel I, Siebert R, Murga Penas EM. Heterozygous and hemizygous *TET2*-mutations in myeloid dysplasias. *medgen*. 2018 Mar;30:146.

La Starza R, Crescenzi B, Nofrini V, Barba G, Matteucci C, Brandimarte L, Pierini V, Testoni N, Musto P, Paolini S, Gianfelici V, Storlazzi CT, Pierini A, Berchicci L, Gorello P, Mecucci C. FISH analysis reveals frequent co-occurrence of 4q24/TET2 and 5q and/or 7q deletions. *Leuk Res.* 2012 Jan;36(1):37-41.

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood.* 2002;99:840–849.

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won HH, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ, MacArthur DG; Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016 Aug 18;536(7616):285-91.

O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufo S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B, Robbertse B, Smith-White B, Ako-Adjei D, Astashyn A, Badretdin A, Bao Y, Blinkova O, Brover V, Chetvernin V, Choi J, Cox E, Ermolaeva O, Farrell CM, Goldfarb T, Gupta T, Haft D, Hatcher E, Hlavina W, Joardar VS, Kodali VK, Li W, Maglott D, Masterson P, McGarvey KM, Murphy MR, O'Neill K, Pujar S, Rangwala SH, Rausch D, Riddick LD, Schoch C, Shkeda A, Storz SS, Sun H, Thibaud-Nissen F, Tolstoy I, Tully RE, Vatsan AR, Wallin C, Webb D, Wu W, Landrum MJ, Kimchi A, Tatusova T, DiCuccio M, Kitts P, Murphy TD, Pruitt KD. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D733-45

Orozco L, Peloso GM, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won HH, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ, MacArthur DG; Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016 Aug 18;536(7616):285-91.

Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W, Karapetyan K, Katz K, Liu C, Maddipatla Z, Malheiro A, McDaniel K, Ovetsky M, Riley G, Zhou G, Holmes JB, Kattman BL, Maglott DR. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 4.

Li Z, Cai X, Cai CL, Wang J, Zhang W, Petersen BE, Yang FC, Xu M. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*. 2011 Oct 27;118(17):4509-18.

Lin TL, Nagata Y, Kao HW, Sanada M, Okuno Y, Huang CF, Liang DC, Kuo MC, Lai CL, Lee EH, Shih YS, Tanaka H, Shiraishi Y, Chiba K, Lin TH, Wu JH, Miyano S, Ogawa S, Shih LY. Clonal leukemic evolution in myelodysplastic syndromes with TET2 and IDH1/2 mutations. *Haematologica*. 2014 Jan;99(1):28-36.

Lin Y, Lin Z, Cheng K, Fang Z, Li Z, Luo Y, Xu B. Prognostic role of TET2 deficiency in myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Jun 27;8(26):43295-43305.

Liu WJ, Tan XH, Luo XP, Guo BP, Wei ZJ, Ke Q, He S, Cen H. Prognostic significance of Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2) gene mutations in adult patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2014 Dec;55(12):2691-8.

Lorsbach RB, Moore J, Mathew S, et al. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia*. 2003;17(3):637–641

Nabel CS, Kohli RM. Molecular biology. Demystifying DNA demethylation. *Science*. 2011;333(6047):1229–1230.

Nakajima H, Kunimoto H. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.* 2014;105(9):1093-9.

National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2018 Sep 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nibourel O, Kosmider O, Cheok M, Boissel N, Renneville A, Philippe N, Dombret H, Dreyfus F, Quesnel B, Geffroy S, Quentin S, Roche-Lestienne C, Cayuela JM, Roumier C, Fenaux P, Vainchenker W, Bernard OA, Soulier J, Fontenay M, Preudhomme C. Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. *Blood.* 2010 Aug 19;116(7):1132-5.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* 1990 Nov 30;250(4985):1233-8. Erratum in: *Science.* 1993 Feb 12;259(5097):878.

Manchev VT, Bouzid H, Antony-Debré I, Leite B, Meurice G, Droin N, Prebet T, Costello RT, Vainchenker W, Plo I, Diop M, Macintyre E, Asnafi V, Favier R, Baccini V, Raslova H. Acquired TET2 mutation in one patient with familial platelet disorder with predisposition to AML led to the development of pre-leukaemic clone resulting in T2-ALL and AML-M0. *J Cell Mol Med.* 2017 Jun;21(6):1237-1242.

Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, et al. TET2 Mutations Improve the New European LeukemiaNet Risk Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology.* 2011;29(10):1373-1381.

Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Görlich D, Schneider S, Konstandin NP, Dufour A, Bräundl K, Ksienzyk B, Zellmeier E, Hartmann L, Greif PA, Fiegl M, Subklewe M, Bohlander SK, Krug U, Faldum A, Berdel WE, Wörmann B, Büchner T, Hiddemann W, Braess J, Spiekermann K; AMLCG Study Group. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2016 Aug 4;128(5):686-98.

Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Patel J, Zhao X, Perna F, Pandey S, Madzo J, Song C, Dai Q, He C, Ibrahim S, Beran M, Zavadil J, Nimer SD, Melnick A, Godley LA, Aifantis I, Levine RL. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*. 2011 Jul 12;20(1):11-24.

O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*. 2010;115(14):2731-9.

Odejide O, Weigert O, Lane AA, Toscano D, Lunning MA, Kopp N, Kim S, van Bodegom D, Bolla S, Schatz JH, Teruya-Feldstein J, Hochberg E, Louissaint A, Dorfman D, Stevenson K, Rodig SJ, Piccaluga PP, Jacobsen E, Pileri SA, Harris NL, Ferrero S, Inghirami G, Horwitz SM, Weinstock DM. A targeted mutational landscape of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2014 Feb 27;123(9):1293-6.

Ono R, Taki T, Taketani T, et al. LCX, leukemia - associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). *Cancer Res*. 2002;62(14):4075–4080.

Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, Baxter EJ, Massie CE, Papaemmanuil E, Menon S, Godfrey AL, Dimitropoulou D, Guglielmelli P, Bellosillo B, Besses C, Döhner K, Harrison CN, Vassiliou GS, Vannucchi A, Campbell PJ, Green AR. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2015 Feb 12;372(7):601-612.

Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F - negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007;21:1960–1963.

Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, et al. Spliceosome mutations involving SRSF2, SF3B1, and U2AF35 in chronic myelomonocytic leukemia: prevalence, clinical correlates, and prognostic relevance. *Am J Hematol*. 2013;88(3):201–206.

Patnaik MM, Wassie EA, Padron E, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in younger patients: molecular and cytogenetic predictors of survival and treatment outcome. *Blood Cancer J.* 2015;5(2):e280.

Patnaik MM, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2018 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2018 Jun;93(6):824-840.

Patnaik MM, Lasho TL, Vijayvargiya P, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, Tefferi A. Prognostic interaction between ASXL1 and TET2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2016 Jan 15;6:e385.

Peller S, Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Hum Mutat.* 2003 Mar;21(3):277-84.

Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O, Do Cruzeiro M, Delhommeau F, Arnulf B, Stern MH, Godley L, Opolon P, Tilly H, Solary E, Duffourd Y, Dessen P, Merle-Beral H, Nguyen-Khac F, Fontenay M, Vainchenker W, Bastard C, Mercher T, Bernard OA. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell.* 2011 Jul 12;20(1):25-38.

Scopim-Ribeiro R, Machado-Neto JA, de Melo Campos P, Niemann FS, Lorand-Metze I, Costa FF, Olalla Saad ST, Traina F. Low Ten-eleven-translocation 2 (TET2) transcript level is independent of TET2 mutation in patients with myeloid neoplasms. *Diagn Pathol.* 2016 Mar 16;11:28.

Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2012 Sep;12(9):599-612.

Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gäken J, Lea NC, Przychodzen B, Mian SA, Nasser EE, Shooter C, Westwood NB, Strupp C, Gattermann N, Maciejewski JP, Germing U, Mufti GJ. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood.* 2010 Nov 11;116(19):3923-32. Doi: 10.1182/blood-2010-03-274704.

Soucie E, Hanssens K, Mercher T, Georgin-Lavialle S, Damaj G, Livideanu C, Chandesris MO, Acin Y, Létard S, de Sepulveda P, Hermine O, Bernard OA, Dubreuil P. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood*. 2012 Dec 6;120(24):4846-9.

Swerdlow, E. Campo, N. Lee Harris, E. Jaffe, S. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J. Vardiman, WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues , 4th edition, S. IARC, Lyon, France, 2008

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009 May 15;324(5929):930-5.

Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Gangat N, Finke CM, Schwager S, Mullally A, Li CY, Hanson CA, Mesa R, Bernard O, Delhommeau F, Vainchenker W, Gilliland DG, Levine RL. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009 May;23(5):905-11.

Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2017 Jan;92(1):94-108.

UCSC Genome Browser: Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 2002 Jun;12(6):996-1006.

Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*. 2008;22:1299–1307.

Vardiman, J. W., Harris, N. L., & Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7),2292-2302.

Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, Kowarsch A, Nadarajah N, Eder C, Dicker F, Fasan A, Haferlach C, Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Kohlmann A. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012 May;26(5):934-42.

Wildeman M, van Ophuizen E, den Dunnen JT, Taschner PE. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the MUTALYZER sequence variation nomenclature checker. *Hum Mutat* 29:6-13 (2008)(PMID: 18000842).

Winters AC, Bernt KM. MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches. *Front Pediatr*. 2017 Feb 9;5:4.

Zink F, Stacey SN, Norddahl GL, Frigge ML, Magnusson OT, Jonsdottir I, Thorgeirsson TE, Sigurdsson A, Gudjonsson SA, Gudmundsson J, Jonasson JG, Tryggvadottir L, Jonsson T, Helgason A, Gylfason A, Sulem P, Rafnar T, Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson DF, Masson G, Kong A, Stefansson K. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood*. 2017 Aug 10;130(6):742-752.

9. Abkürzungsverzeichnis

AILT	Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom
AML	Akute myeloische Leukämie
BAP	Bruchpunkt-flankierende Sonden (Break Apart Rearrangement Probe)
B	Blaues Signal
BB	Blutbild
bzw.	Beispielsweilen
CHIP	clonal hematopoiesis of indeterminate potential
CN-LOH	Copy-numer neutral „loss of heterozygosity“
CML	Chronische myeloische Leukämie, BCR-ABL+
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CMV	Cytomegalovirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
ddNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
ET	Essentielle Thrombozytopenie
F	Fusionssignal
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Grünes Signal
HSC	Hämatopoetischen Stammzellen
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
LOH	„loss of heterozygosity“
LSI	Locus - spezifische Sonden (Locus Specific Identifiers)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
NGS	Sequenzierung der neuen Generation (Next-Generation Sequencing)
NTX	Nierentransplantation
OT	Objektträger
PCR	Polymerasekettenreaktion
PV	Polyzythämia vera
R	Rotes Signal

RT	Raumtemperatur
SNP	Small Nukleotide Polymorphism
sog.	Sogenannt
TDG	Thymin-DNA-Glykosylase
u. a.	Unter anderem
UPD	Uniparentale Disomie
VAF	Variant Allel Frequency
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
z. B.	Zum Beispiel

9.1. Buchstabencode der Aminosäuren

Alanin	ALA	A
Arginin	ARG	R
Asparagin	ASN	N
Asparaginsäure	ASP	D
Cystein	CYS	C
Glutamin	GLN	Q
Glutaminsäure	GLU	E
Glycin	GLY	G
Histidin	HIS	H
Isoleucin	IIE	I
Leucin	LEU	L
Lysin	LYS	K
Methionin	MET	M
Phenylalanin	PHE	F
Prolin	PRO	P
Serin	SER	S
Threonin	THR	T
Tryptophan	TRP	W
Tyrosin	TYR	Y
Valin	VAL	V

10. Anhang

10.1. Tabelle der Fälle mit normalem Karyotyp mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse

Tabelle 37. Vollständiger FISH Befund der Gruppe 1: Fälle mit normalem Karyotyp. Vollständige Auswertung der durchgeführten FISH-Untersuchungen auf, mit Angabe des Geschlechtes und Alters des dazugehörigen Patienten.

Nr	Geschl.	Alter	Konsensus Karyotyp der Chromosomen-Bänderung und FISH Befunde
1	weiblich	62	46,XX[23].nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
2	weiblich	72	46,XX[20].nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
3	männlich	74	46,XY[23].nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
4	männlich	39	46,XY[20].nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
5	weiblich	47	46,XX[20].nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
6	männlich	77	46,XY[16].nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
7	männlich	67	46,XY[18].nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
8	weiblich	75	46,XX[22].nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
9	männlich	48	46,XY[24].nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
10	männlich	59	46,XY[20].nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
11	weiblich	72	46,XX[20].nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 1), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)

			2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
26	männlich	18	46,XY[10].nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7q (WBS x 2, D7S486/D7S522 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
27	männlich	73	46,XY[21].nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7q (WBS x 2, D7S486/D7S522 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
28	weiblich	73	46,XX[20].nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (4q12 prox x 2, 4q12 span x 2, PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5q33 (EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 6 (CEP6 x 2, PRDM1 x 2, TNFAIP3 x 2), 8 (FGFR1 prox x 2, FGFR1 dist x 2, MYC prox x 2, MYC dist x 2), 9q34 (ABL x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 12 (ETV6 prox x 2, ETV6 dist x 2, DDIT3 prox x 2, DDIT3 dist x 2), 13q14 (D13S319 x 2, D13S25 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 22q11 (BCR x 2)
29	männlich	37	46,XY[20].nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (4q12 prox x 2, 4q12 span x 2, 4q12 dist x 2, PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5q33 (PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 8p12 (FGFR1 prox x 2, FGFR1 dist x 2), 9q34 (ABL x 2), 12p13 (ETV6 prox x 2, ETV6 dist x 2), 22q11 (BCR x 2)
30	männlich	57	46,XY[20].nuc ish 4q (4q12 prox x 2, 4q12 span x 2, 4q12 dist x 2, PDGFRA x 2, TET2 x 1), 5q32 (PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 8p12 (FGFR1 prox x 2, FGFR1 dist x 2), 9q34 (ABL x 2), 12p13 (ETV6 prox x 2, ETV6 dist x 2), 22q11 (BCR x 2)

10.2. Tabelle der Fälle mit aberrantem Karyotyp mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse

Tabelle 38. Vollständiger FISH Befund der Gruppe 2: Fälle mit aberrantem Karyotyp. Vollständige Auswertung der durchgeführten FISH-Untersuchungen auf, mit Angabe des Geschlechtes und Alters des dazugehörigen Patienten.

Nr	Geschl.	Alter	Karyotyp mit FISH Befund [x/100 ausgewerteten Interphase-Kernen]
31	weiblich	71	46,XX,del(5)(q14q34)[6]/46,XX[2]. nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 1, PDGFRB prox x 1, PDGFRB dist x 1), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
32	männlich	73	46,XY,del(5)(q23q34)[4]/46,XY[21]. nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 1, PDGFRB prox x 1, PDGFRB dist x 1), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 1), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
33	männlich	77	45,X,-Y[28]. nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
34	männlich	72	47,XY,+14[9]/47,XY,+8[5]/46,XY[7]. nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 3), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
35	männlich	86	45,X,-Y[20]. nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 1 , MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
36	weiblich	82	46,XX,del(5)(q14q34)[12]/46,XX[4]. nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 1, PDGFRB prox x 1, PDGFRB dist x 1), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
37	weiblich	78	47,XX,+14[13]/46,XX[2]. nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
38	weiblich	76	46,XX,del(8)(q21q23)[17]/46,idem,+1,der(1;15)(q10;q10)[3]. nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 1), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
39	weiblich	69	47,XX,+8[9]/46,XX[3]. nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 3), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
40	männlich	77	49,XY,+X,+11,+14[6]/46,XY[22]. nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 3, MLL dist x 3), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)

41	weiblich	67	44,XX,del(5)(q14q34),-7,-18[11]/46,XX[9]. nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 1, PDGFRB prox x 1, PDGFRB dist x 1), 7 (CEP7 x 1, 7q22 x 1, 7q35 x 1), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 1), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
42	männlich	72	47,XY,+8[14]. nuc ish 4q X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 3), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
43	männlich	86	46,XY,del(20)(q11q13)[18]/46,XY[2]. nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 1), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
44	weiblich	69	46,XX,del(5)(q14q34)[10]/46,XX[11]. nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 1, PDGFRB prox x 1, PDGFRB dist x 1), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
45	weiblich	74	47,XX,+8[8]/46,XX[2]. nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 3), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
46	weiblich	83	46,XX,del(5)(q14q34)[7]/45,idem,del(2)(p13),der(4)t(?2;4)(p22;q11),der(9)del(9)(p12)del(9)(q31),der(12;17)(q10;q10)[9]/46,XX[4]. nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 1, PDGFRB prox x 1, PDGFRB dist x 1), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 1 , MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 1), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
47	weiblich	82	47,XX,+8[10]/46,X,?del(X)(q?13q?21)[5]/46,XX[5]. nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 3), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2) *
48	männlich	79	46,XY,del(20)(q12q13)[16]. nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 1), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
49	männlich	53	46,XY,del(20)(q12q13)[14]. nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 1), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
50	weiblich	77	46,XX,r(11)(p14q13)[13]. nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 1, MLL dist x 1), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
51	männlich	79	45,X,-Y[16]/46,XY[1]. nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
52	männlich	75	45,XY,-17,-19,-22,+2r[7]/46,XY[3]. nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x

			2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 1 , MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
53	männlich	83	46,XY,del(5)(q14q34)[14]/46,XY[5].nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 1, PDGFRB prox x 1, PDGFRB dist x 1), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
54	weiblich	78	46,XX,del(11)(q22q25)[6]/46,XX[25].nuc ish X (CEPX x 2), Y (CEPY x 0), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7 (CEP7 x 2, 7q22 x 2, 7q35 x 2), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 1, MLL dist x 1), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)
55	männlich	74	46,XY,-5,r(6)(p25q16)dup(6)(p12p24),add(7)(q21),+mar[5]/46,idem,del(8)(q12)[19]/46,XY[5].nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 4q (PDGFRA x 2, TET2 x 2), 5 (D5S721/D5S23 x 4, EGR1 x 1, PDGFRB prox x 1, PDGFRB dist x 1), 7 (CEP7 x 1, 7q22 x 1, 7q35 x 1), 8q22 (RUNX1T1 x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 18 (CEP18 x 2), 20q12 (D20S108 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, RUNX1 x 2)

* Teils Tetraploid, viele Signalkonstellationen um die Nachweisgrenze herum, nur Trisomie 8 eindeutig.

10.3. Tabelle „Literaturrecherche“ (gekürzt)

Tabelle 39. Daten der Literaturrecherche. Diese Tabelle enthält den gekürzten Datensatz der durch die Literaturrecherche zusammengestellt wurde. Es wurden Alter, Geschlecht und Erkrankung der Patienten aufgenommen. Die Lokalisation und Art der Mutation, die Veränderung auf Proteinlevel wurden übernommen, der „PolyPhen-2 score“ wurde wenn sinnvoll ergänzt. Falls interessante weitere Daten wie Karyotyp oder Allelstatus verfügbar waren, wurden diese ebenfalls eingepflegt.

Nr.	Geschlecht	Alter	Erkrankung	Exon	Auswirkung	Substitution	PolyPhen-2 score	TET2-Mutation; Status (Technik für Deletion)	Karyotyp
1)	Männlich	42	T2-ALL, dann AML-M0	Exon 11	Missense	p.P1962T	0,995	Unbekannt	Unbekannt
2)	Männlich	?	MDS (RCMD)	Exon 7	Missense	p.Ser1284Phe	1	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XY[12]
3)	Weiblich	?	MDS (RAEB-2)	Exon 3	Nonsense	p.Arg550*	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XX[20]
4)	Weiblich	?	MDS (RCMD)	Exon 11	Frameshift	p.Leu1855Trpfs*32	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XX[24]
5)	Männlich	75	Essentielle Thrombozytopenie	Exon 3	Frameshift	p.Phe1041Ilefs*2	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
6)	Weiblich	76	Essentielle Thrombozytopenie	Exon 7	Missense	p.Gly1297Glu	1	Unbekannt	Unbekannt
7)	Männlich	83	Essentielle Thrombozytopenie	Exon 9	Missense	p.Arg1359Leu	0,999	Unbekannt	Unbekannt
8)	Weiblich	76	Essentielle Thrombozytopenie	Exon 3	Frameshift	p.Glu448Lysfs*2	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
9)	Weiblich	60	Essentielle Thrombozytopenie	Exon 3	Nonsense	p.Gln886*	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
10)	Männlich	74	Post-ET-Myelofibrose	Exon 3	Frameshift	p.(Val218Trpfs*32)	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
11)	Weiblich	71	Post-ET-Myelofibrose	Exon 11	Nonsense	p.Leu1816*	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
12)	Männlich	77	Post-PV-Myelofibrose	Exon 7	Frameshift	p.Cys1289Phefs*74	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
13)	Männlich	70	Polycythaemia vera	Exon 3	Frameshift	p.Gln963Serfs*44	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
14)	Männlich	63	Polycythaemia vera	Exon 3	Nonsense	p.Gln273*	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
15)	Weiblich	76	Polycythaemia vera	Exon 11	Frameshift	p.Tyr1679Leufs*8	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
16)	Weiblich	82	Polycythaemia vera	Exon 3	Frameshift	p.Ser657Thrfs*42	Truncating	Unbekannt	Unbekannt

17)	Weiblich	52	Essentielle Thrombozytopenie	Exon 3	Frameshift	p.Ile750Glu fs*2	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
18)	Männlich	64	Essentielle Thrombozytopenie	Exon 3	Nonsense	p.Gln361*	Truncating	homozygot; keine	Unbekannt
				Exon 3	Frameshift	p.Ala951Lys fs*19	Truncating		
19)	Weiblich	78	Myelofibrose	Exon 3	Nonsense	p.Gln652*	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
20)	Weiblich	57	Myelofibrose	Exon 3	Nonsense	p.Leu1119*	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
21)	Weiblich	60	Post-PV-Myelofibrose	Exon 6	Missense	p.Lys1243Arg	0	Unbekannt	Unbekannt
22)	Weiblich	46	Polycythaemia vera	Exon 11	Frameshift	p.Gln1632His fs*63	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
23)	Männlich	49	Polycythaemia vera	Exon 11	Frameshift	p.Ser1776Leu fs*44	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
24)	Männlich	66	Polycythaemia vera	Exon 11	Nonsense	p.Cys1642*	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
25)	Männlich	51	Polycythaemia vera	Exon 3	Nonsense	p.Glu807*	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
26)	Weiblich	51	Polycythaemia vera	Exon 3	Frameshift	p.Thr229Asn fs*21	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
27)	Männlich	72	Polycythaemia vera	Exon 3	Nonsense	p.Leu1119*	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
28)	Weiblich	73	Polycythaemia vera	Exon 11	Nonsense	p.Gln1632*	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
29)	?	?	Primäre AML (FAB M4)	Exon 11	Missense	p.Arg1896Met	1	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Unbekannt
30)	?	?	Primäre AML (FAB M4)	Exon 11	Missense	p.Ile1873Thr	1	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Unbekannt
31)	?	?	MDS RAEB2	Exon 3	Frameshift	p.Arg581fs	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Unbekannt
32)	?	?	MDS RAEB1	Exon 11	Nonsense	p.Gln1624*	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Unbekannt
33)	Weiblich	56	MDS RAEB2	Exon 3	Frameshift	p.Gln769 FS	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XX,del(5)(q12q34)(2)/46,idem,add(1)(p3?3),r(13)[8]/45,idem,del(9)(p13),-17[2]/46,XX[10]
34)	Weiblich	56	MDS RA	Exon 3 Exon 7	Nonsense Missense	p.Arg544* p.Lys1299Glu	Truncating 1	homozygot; keine (SNP-Array)	47,XX,+min1,+mar
35)	Männlich	73	MDS RAEB1	Exon 11	Frameshift	p.Tyr1560 FS	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
36)	Männlich	61	MDS RAEB1	Exon 3	Nonsense	p.Gln685X	Truncating	hemizygot; LOH (Del-Zytogenetik+SNP-Array)	46,XY,del(4)(q24)[20]
37)	Weiblich	49	MDS RA	Exon 11		No amplification of 5' Exon 11	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XX[20]

38)	Männlich	68	MDS RAEB1	Exon 11	Missense	p.Leu1872Pro	1	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
39)	Männlich	80	MDS RARS-T	Exon 3	Frameshift	p.His658 FS	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
40)	Weiblich	65	MDS RAEB2	Exon 3 Exon 11	Frameshift Nonsense	p.Ser609 FS p.Leu1819X	Truncating Truncating	homozygot; keine (SNP-Array)	46,XX[20]
41)	Männlich	74	MDS RAEB1	Exon 3	Frameshift	p.Leu560 FS	Truncating	hemizygot, LOH (Del-Zytogenetik)	46,XY,del(4)(q24)[20]
42)	Männlich	75	MDS RAEB2	Exon 3	Frameshift	p.Leu699X	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
43)	Männlich	92	MDS RA	Exon 11	Nonsense	p.Gln1834*	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
44)	Männlich	75	MDS RCMD-RS	Exon 3	Frameshift	p.Glu711 FS	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
45)	Männlich	71	MDS RAEB2	Exon 3 Exon 11	Nonsense Frameshift	p.Gln943X p.Thr1883 FS	Truncating Truncating	homozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
46)	Männlich	83	MDS RCMD	Exon 10	Nonsense	p.Arg1465X	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	45,XY,-20[2]/46,XY[18]
47)	Männlich	60	RAEB1	Exon 4 Exon 11	Frameshift Missense	p.Glu1137 FS p.Ile1873Thr	Truncating 1	homozygot; keine (SNP-Array)	46,XY,del(11)(q13)[20]
48)	Männlich	70	MDS RAEB1	Exon 5	Splicesite	mutation of splice acceptor site	Splicing	hemizygot, LOH (Del-Zytogenetik)	46,XY,del(4)(q24)[20]
49)	Männlich	79	MDS RA	Exon 11	Frameshift	p.Thr1883 FS	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XX[20]
50)	Männlich	80	MDS AML	Exon 3	Frameshift	p.Gly908 FS	Truncating	hemizygot, LOH (Del-Zytogenetik)	43,XY,-4,-5,-6,-7,+?der(5;7)(p10;q10),add(11)(p15),-17,-18,+r(?),+mar,+mar[17]/46,XY[4]
51)	Weiblich	61	MDS RA	Exon 9 Exon 11	Frameshift Frameshift	p.Glu1357 FS p.Thr1554 FS	Truncating Truncating	homozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
52)	Weiblich	74	MDS RAEB1	Exon 11	Frameshift	p.Pro1575 FS	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XX,-7,+mar[3]/46,XX[17]
53)	Männlich	65	MDS RAEB1	Exon 11	Nonsense	p.Gln1624*	Truncating	hemizygot, LOH (Del-SNP-Array)	45,Y,t(X;4)(p21;q24)
54)	Weiblich	56	MDS RAEB2	Exon 11	Missense	p.Ile1873Thr	1	hemizygot, LOH (Del-SNP-Array)	46,XX,t(3;4)(q26;q24)

55)	Männlich	59	RCMD-RS	Exon 11	Missense	p.Gly1913Asp	0,995	homozygous, LOH durch UPD (SNP-Array)	45,X,-Y[17]/46,XY[3]
56)	Männlich	76	CMML-1	Exon 7	Frameshift	p.insT1310	Truncating	homozygous, LOH durch UPD (SNP-Array)	46,XY[20]
57)	Männlich	60	CMML-1	Exon 7	Missense	p.Glu1318Gly	1	homozygous, LOH durch UPD (SNP-Array)	45,X,-Y[20]
58)	Männlich	77	CMML-1 + CLL	Exon 3	Frameshift	delG2	Truncating	homozygous, LOH durch UPD (SNP-Array)	46,XY[20]
59)	Männlich	69	CMML-2	Exon 3	Nonsense	p.Ser835*	Truncating	homozygous, LOH durch UPD (SNP-Array)	46,XY[20]
60)	Männlich	78	CMML-1	Exon 4	Missense	p.Arg1167Thr	1	homozygous, LOH durch UPD (SNP-Array)	46,XY[20]
61)	Männlich	60	MDS/MPN	Exon 10	Frameshift	p.delG1439	Truncating	homozygous, LOH durch UPD (SNP-Array)	47,XY,+8[4]/46,XY[16]
62)	Männlich	70	CMML-2	Exon 3	Nonsense	p.Leu1040*	Truncating	homozygous, LOH durch UPD (SNP-Array)	46,XY[20]
63)	Männlich	74	CMML-1	Exon 9	Missense	p.Pro1367Ser	0,989	hemizygot, LOH (Del-SNP-Array)	45,X,-Y[20]
64)	Männlich	80	RCMD-RS	Exon 3	Nonsense	p.Ser509*	Truncating	hemizygot, LOH (Del-SNP-Array)	46,XY[20]
65)	Männlich	76	MDS/MPN-U ≥ 5%	Exon 7	Missense	p.Phe1287Leu	0,989	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY,del(7)(q11.2),del(20)(q11q13),-21,+r[cp20]
66)	Männlich	71	CMML-2	Exon 7	Missense	p.Lys1299Asn	1	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
67)	Weiblich	58	CMML-2	Exon 3	Missense	p.Gln1084Pro	0,325	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XX,del(17)(q24)[6]/46,XX[24]
68)	Männlich	68	CMML-1	Exon 3	Missense	p.Ala308Thr	0,361	heterozygot; keine (SNP-Array)	47,XY,+19[20]

69)	Männlich	50	CMML-1	Exon 7 Exon 11	Missense Nonsense	p.Arg1302Gly p.Ser1638*	1 Truncating	homozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
70)	Unbekannt	45	CMML-1	Exon 3	Nonsense	p.Tyr867His*	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	Unbekannt
71)	Weiblich	73	CMML-1	Exon 11	Missense	p.Ile1873Thr	1	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XX[20]
72)	Männlich	74	RARS-T	Exon 11	Missense	p.Val1718Leu	0,007	heterozygot; keine (SNP-Array)	47,XY,+8[20]
73)	Männlich	82	MDS/MPN-U < 5%	Exon 3	Nonsense	p.Ser631*	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
74)	Männlich	78	MDS/MPN-U < 5%	Exon 3	Missense	p.Ser817Thr	0,094	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
75)	Männlich	80	MDS/MPN-U < 5%	Exon 3	Missense	p.Pro399Leu	0,455	heterozygot; keine (SNP-Array)	47,XY,+8[7]/46,XY[13]
76)	Männlich	56.0	AML	Exon 3	Nonsense	p.Ser268Trp* (8%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Komplex
77)	Männlich	44.9	AML	Exon 11	Nonsense	p.Glu1918*(75%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Komplex
78)	Weiblich	75.3	AML	Exon 3 Exon 7	Frameshift Frameshift	p.Pro1079Argfs*8 (50%) p.Gly1282Valfs*82 (11%)	Truncating Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Komplex
79)	Männlich	73.2	MDS RAEB-1	Exon 3	Frameshift	p.Glu637Ilefs*2 (66%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Komplex
80)	Weiblich	71.8	AML	Exon 3	Frameshift	p.His629Glnfs*10(32%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Mit einer der rekurrenten Translokationen
81)	Männlich	53.8	AML	Exon 3 Exon 11	Nonsense Nonsense	p.Ser588*(6%) p.Gln1539* (7%)	Truncating Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Mit einer der rekurrenten Translokationen
82)	Männlich	64.3	MPN	Exon 3	Frameshift	p.Leu615Alafs*23 (27%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Komplex
83)	Weiblich	80.8	AML	Exon 3	Frameshift	p.Thr556Asnfs*11 (74%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XX
84)	Männlich	73.3	CMML-1	Exon 3	Nonsense	p.Gln674* (80%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XY
85)	Männlich	65.1	CMML-1	Exon 3	Nonsense	p.Gly898* (85%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XY
86)	Männlich	76	CMML-1	Exon 5	Splicesite	splice site mutation (75%)	Splicing	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XY

87)	Männlich	81.6	CMML-1	Exon 7	Missense	p.Cys1271Trp (82%)	1	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XY
88)	Weiblich	84.7	CMML-1	Exon 10	Nonsense	p.Gln1435* (39%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XX
89)	Männlich	70.8	CMML-1	Exon 3	Nonsense	p.Ser675* (83%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XY
90)	Weiblich	71.7	CMML-2	Exon 3	Nonsense	p.Ser509* (81%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XX
91)	Weiblich	65.4	CMML-2	Exon 3	Frameshift	p.Ala1772Glyfs*4 (51%)	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XX
92)	Weiblich	76.8	MDS	Exon 3 Exon 6 Exon 11	Nonsense Missense Nonsense	p.Arg550* (8%) p.Cys1221Arg (9%) p.Tyr1631* (42%)	Truncating 1 Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XX
93)	Männlich	75.5	CMML-2	Exon 8	Missense	p.Ala1341Glu (90%)	1	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Keine der rekurrenten Translokationen. Andere Veränderungen
94)	Männlich	70.9	CMML-2	Exon 11 Exon 3	Missense Frameshift	p.Arg1739Ile (96%) p.Thr940Pfs*13 (94%)	1 Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	Keine der rekurrenten Translokationen. Andere Veränderungen
95)	Männlich	74.6	CMML-2	Exon 3 Exon 11	Nonsense Missense	p.Gln440* [44.38%] p.Arg1896Gly [49.85%]	Truncating 1	homozygot; keine	46,XY[20]
96)	Männlich	72.2	CMML-1	Exon 5 Exon 11 Exon 11 Exon 11	Missense Missense Nonsense Missense	p.Cys1193Phe [4.23%] p.Arg1572Trp [40.38%] p.Tyr1628* [40.47%] p.Lys1905Glu [44.17%]	1 1 Truncating 1	homozygot; keine	46,XY[20]
97)	Weiblich	77.1	CMML-2	Exon 6 Exon 10	Missense Nonsense	p.Arg1261Cys [22.95%] p.Arg1404* [44.8%]	1 Truncating	homozygot; keine	Unbekannt
98)	Männlich	83.9	CMML-1	Exon 3 Exon 11	Nonsense Frameshift	p.Gln876X [41.81%] p.delAsn1613 FS [56.25%]	Truncating Truncating	homozygot; keine	45,X,-Y[2]/47,X,-Y,+7,+8 [13]
99)	Männlich	74.8	CMML-1	Exon 6 Exon 9	Missense Missense	p.Trp1233Gly [26.06%] p.Gly1361Asp [10.3%]	1 1	homozygot; keine	46,XY[20]
100)	Weiblich	58.2	CMML-1	Exon 3 Exon 7	Nonsense Missense	p.Trp1003* [23.85%] p.Ser1303Arg [29.66%]	Truncating 1	homozygot; keine	46,XX[15]
101)	Weiblich	84.2	CMML-1	Exon 3 Exon 3	Frameshift Frameshift	p.delCys724 FS [18.64%] p.delAla1096 FS [52.7%]	Truncating Truncating	homozygot; keine	46,XX[21]
102)	Männlich	72.8	CMML-1	Exon 10	Nonsense	p.Arg1452* [42.25%]	Truncating	homozygot; keine	46,XY[20]

				Exon 11	Missense	p.Thr1884Ala [50.33%]	1		
103)	Männlich	?	de novo AML	Exon 3	Nonsense	p.Gln417*	Truncating	Unbekannt	Unbekannt
104)	Männlich	?	de novo AML	Exon 3	Nonsense	p.Cys784*	Truncating	Unbekannt	46,XY
105)	Weiblich	?	de novo AML	Exon 7	Nonsense	p.Gly1313*	Truncating	Unbekannt	46,XX,del(15)(q1?4;q2?2)
106)	Männlich	?	de novo AML	Exon 11	Nonsense	p.Arg1516*	Truncating	Unbekannt	46,XY
107)	Männlich	?	de novo AML	Exon 11	Nonsense	p.Tyr2001*	Truncating	Unbekannt	46,XY
108)	Weiblich	?	de novo AML	Exon 9	Missense	p.Ser1292Arg	1	homozygot; keine	46,XX,t(3;5)(q25;q34)
				Exon 9	Nonsense	p.Ala1355*	Truncating		
109)	Männlich	?	de novo AML	Exon 3	Missense	p.Pro101His	0,999	homozygot; keine	46,XY
				Exon 3	Nonsense	p.Gln690*	Truncating		
110)	Männlich	?	de novo AML	Exon 11	Frameshift	p.Leu1637fs	Truncating	Unbekannt	46,XY
111)	Weiblich	?	de novo AML	Exon 4	Frameshift	p.Asn1156fs	Truncating	Unbekannt	46,XX
112)	Weiblich	?	de novo AML	Exon 6	Missense	p.Val1199Ile	0,997	homozygot; keine	46,XX,t(4;11)(q?;q1?),del(7)(q2?1)
				Exon 10	Frameshift	Glu1437fs	Truncating		
113)	Männlich	?	de novo AML	Exon 3	Frameshift	p.G613fs	Truncating	Unbekannt	46,XY
114)	Weiblich	?	de novo AML	Exon 7	Missense	p.Cys1271Trp	1	homozygot; keine	46,XX
				Exon 11	Frameshift	p.Asp1830fs	Truncating		
115)	Weiblich	?	de novo AML	Exon 3	Frameshift	p.L226Rfs	Truncating	homozygot; keine	Unbekannt
				Exon 9	Missense	Gly1370Val	1		
116)	Männlich	?	de novo AML	Exon 7	Missense	p.Gly1282Asp	1	Unbekannt	46,XY
117)	Männlich	?	de novo AML	Exon 3	Missense	p.Thr492Ser	0,3	Unbekannt	46,XY
118)	Weiblich	?	de novo AML	Exon 3	Missense	p.Ser282Phe	0,976	Unbekannt	46,XX
119)	Männlich	?	de novo AML	Exon 3	Missense	p.Ser282Phe	0,976	Unbekannt	47,XY,t(8;21)(q22;q22),der(8)t(8;21)
120)	Weiblich	?	de novo AML	Exon 3	Missense	p.Gln548Leu	0,112	Unbekannt	46,XX
				Exon 9	Missense	p.Phe1368Tyr	1		
121)	Männlich	?	de novo AML	Exon 3	Missense	p.Gly773Val	0,132	Unbekannt	46,XY,inv(16)(p13q22)
122)	Männlich	76	AML	Exon 3	Frameshift	p.Asn741fs*8	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XY,t(4;17)(q24;q25)[7]/46,idem,del(7)(q22q36)[3]
123)	Weiblich	73	MDS (RAEB)	Exon 11	Missense	p.Val1718Leu	0,007	heterozygot; Keine (Del-FISH)	48,XX,der(2)t(2;4)(p23;q24),+der(2)t(2;?)(p?;?),der(3)t(3;?)(p21;?),der(5)del(5)(q31-q34)add(5)(q34),-7,+8,der(12)add(12)(p13),+18[15]

124)	Weiblich	82	CMML	Exon 11	Nonsense	p.Arg1516*	Truncating	hemizygot; LOH (Del-Zytogenetik+FISH)	46,XX,del(4)(q21q26)[20]
125)	Männlich	63	CMML	Exon 11	Frameshift	p.Cys1780fs*6	Truncating	hemizygot; LOH (Del-FISH)	46,XY,ins(5;4)(q22;q22 q26)[20]
126)	Männlich	68	CMML	Exon 3	Nonsense	p.Cys470*	Truncating	hemizygot; LOH (Del-Zytogenetik+FISH)	46,XY,del(4)(q21q26)[18]
127)	Weiblich	88	MDS	Exon 3 Exon 10	Frameshift Nonsense	p.Lys504Glnfs*28 p.Arg1465*	Truncating Truncating	hemizygot; LOH (SNP-Array)	46,XX
128)	Männlich	67	RAEB-1	Exon 10	Frameshift	p.A1512Nfs*58	Truncating	hemizygot; LOH (Del-SNP-Array)	46,XY[10]
129)	Weiblich	59	RAEB-2	Exon 3	Nonsense	p.Q278*	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XX[15]
130)	Weiblich	73	RAEB-2	Exon 3 Exon 3	Frameshift Nonsense	p.S231Vfs*2 p.qQ916*	Truncating Truncating	homozygot; keine (SNP-Array)	Unbekannt
131)	Männlich	45	RAEB-1	Exon 3	Missense	p.M638V		heterozygot; keine (SNP-Array)	47,XY,+8[2]
132)	Weiblich	67	RAEB-1	Exon 3	Frameshift	p.F1104Lfs*2	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XX[20]
133)	Männlich	88	RAEB-2	Exon 10	Frameshift	p.A1512Efs*59	Truncating	hemizygot; LOH (Del-SNP-Array)	47,XY,+8[12]
134)	Männlich	73	RAEB-2	Exon 3 Exon 3	Frameshift Nonsense	p.T313Nfs*18 p.Q324*	Truncating Truncating	homozygot; keine (SNP-Array)	47,XY,+X[18]
135)	Weiblich	88	RAEB-2	Exon 9 Exon 11	Missense Nonsense	p.L1360Q p.Q1654*	1 Truncating	homozygot; keine (SNP-Array)	46,XX[7]
136)	Männlich	80	RAEB-2	Exon 3 Exon 11	Nonsense Missense	p.Q649* p.A1876V	Truncating 1	homozygot; keine (SNP-Array)	Unbekannt
137)	Männlich	74	RAEB-1	Exon 7	Missense	p.S1303R	1	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
138)	Weiblich	65	RAEB-2	Exon 3	Frameshift	p.L560Rfs*8	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XX,-5,-6,del(7)(p21), -10,-18,add(19)(q13), +4mar[12]/46,XX[2]
139)	Männlich	57	RAEB-1	Exon 5	Splicesite	X	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[20]
140)	Männlich	77	RAEB-2	Exon 6	Frameshift	p.A1224Qfs*2	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	Unbekannt
141)	Männlich	67	RCMD	Exon 3	Nonsense	p.Q635*	Truncating	heterozygot; keine	47,XY,+mar[2]/46,XY[15]

								(SNP-Array)	
142)	Weiblich	62	RCMD	Exon 6	Missense	p.R1214W	1	homozygot; keine (SNP-Array)	47,XX,+mar1[3]/46~47,XX,-9,+mar1,+mar2[cp4]/46,XX[9]
				Exon 9	Missense	p.R1359P	1		
143)	Männlich	78	RCMD	Exon 3	Missense	p.R814C	0.034	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[19]
				Exon 3	Frameshift	p.P480Lfs*	Truncating		
144)	Männlich	77	RAEB-1	Exon 7	Missense	p.C1271W	1	heterozygot; keine (SNP-Array)	45,X,-Y[25]
145)	Männlich	86	RAEB-1	Exon 3	Nonsense	p.Q323*	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[26]
146)	Weiblich	72	RARS	Exon 3	Frameshift	p.Y380Sfs*	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XX[28]
147)	Männlich	85	RCMD	Exon 7	Frameshift	p.L1276Wfs*	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY,+1,der(1;7)
148)	Männlich	83	RAEB-2	Exon 11	Nonsense	p.Q1540*	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	46,XY[31]
149)	Männlich	X	MDS-U	Exon 3	Frameshift	p.Q317Rfs*30	Truncating	homozygot; keine (SNP-Array)	Unbekannt
				Exon 7	Missense	p.C1289F	1		
150)	Männlich	76	RAEB-2	Exon 3	Nonsense	p.Q591*	Truncating	heterozygot; keine (SNP-Array)	47,XY,+9[20]
151)	Männlich	69	RAEB-1	Exon 3	Nonsense	p.Q910*	Truncating	hemizygot, LOH (Del-SNP-Array)	47,XY,+8[15]

